

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0615962-1 A2**

(22) Data de Depósito: 27/07/2006
(43) Data da Publicação: 31/05/2011
(RPI 2108)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 38/04 2006.01

(54) Título: USO DE UM COMPOSTO SELECIONADO DO GRUPO QUE CONSISTE EM UM INIBIDOR PROTEASSOMAL, UM INIBIDOR DE AUTOFAGIA, UM INIBIDOR LISSOSSOMAL, UM INIBIDOR DO TRANSPORTE DE PROTEÍNA DO ER AO GOLGI, UM INIBIDOR DE CHAPERONINA HSP90, UM ATIVADOR DA RESPOSTA A CHOQUE TÉRMICO, UM INIBIDOR DE GLICOSIDASE, E UM INIBIDOR DE HISTONA DEACETILASE, USO DE 11-CIS-RETINAL OU 9-CIS-RETINAL E UM COMPOSTO SELECIONADO DO GRUPO QUE CONSISTE EM UM INIBIDOR PROTEASSOMAL, UM INIBIDOR DE AUTOFAGIA, UM INIBIDOR LISSOSSOMAL, UM INIBIDOR DO TRANSPORTE DE PROTEÍNA DO ER AO GOLGI, UM INIBIDOR DE CHAPERONINA HSP90, UM ATIVADOR DE RESPOSTA A CHOQUE TÉRMICO, UM INIBIDOR DE GLICOSIDASE, E UM INIBIDOR DE HISTONA DEACETILASE, MÉTODO PARA AUMENTAR A QUANTIDADE DE UM CONFORMAÇÃO BIOQUIMICAMENTE FUNCIONAL DE UMA PROTEÍNA EM UMA CÉLULA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE UM PCD OCULAR, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE RETINITE PIGMENTOSA, KIT PARA O TRATAMENTO DE UM PCD OCULAR, KIT PARA O TRATAMENTO DE RETINITE PIGMENTOSA, MÉTODO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE UM COMPOSTO ÚTIL PARA O TRATAMENTO DE UM INDIVÍDUO QUE TEM UM PCD OCULAR, MÉTODO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE UM COMPOSTO ÚTIL PARA O TRATAMENTO DE UM INDIVÍDUO QUE TEM RETINITE PIGMENTOSA, USO DE UM INIBIDOR PROTEASSOMAL OU UM INIBIDOR DE AUTOFAGIA E MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE EM UMA CONFORMAÇÃO BIOQUIMICAMENTE FUNCIONAL

(57) Resumo: USO DE UM COMPOSTO SELECIONADO DO GRUPO QUE CONSISTE EM UM INIBIDOR PROTEASSOMAL, UM INIBIDOR DE AUTOFAGIA, UM INIBIDOR LISSOSSOMAL, UM INIBIDOR DO TRANSPORTE DE PROTEÍNA DO ER AO GOLGI, UM INIBIDOR DE CHAPERONINA HSP90, UM ATIVADOR DA RESPOSTA A CHOQUE TÉRMICO, UM INIBIDOR DE GLICOSIDASE, E UM INIBIDOR DE HISTONA DEACETILASE, USO DE 11- CIS-RETINAL OU 9-CIS-RETINAL E UM COMPOSTO SELECIONADO DO GRUPO QUE CONSISTE EM UM INIBIDOR PROTEASSOMAL, UM INIBIDOR DE AUTOFAGIA, UM INIBIDOR LISSOSSOMAL, UM INIBIDOR DO TRANSPORTE DE PROTEÍNA DO ER AO GOLGI, UM INIBIDOR DE CHAPERONINA HSP90, UM ATIVADOR DE RESPOSTA A CHOQUE TÉRMICO, UM INIBIDOR DE GLICOSIDASE, E UM INIBIDOR DE HISTONA DEACETILASE, MÉTODO PARA AUMENTAR A QUANTIDADE DE UM CONFORMAÇÃO BIOQUIMICAMENTE FUNCIONAL DE UMA PROTEÍNA EM UMA CÉLULA, COMPOSIÇÃO FARMACEUTICA PARA O TRATAMENTO DE UM PCD OCULAR, COMPOSIÇÃO FARMACEUTICA PARA O TRATAMENTO DE RETINITE PIGMENTOSA, KIT PARA O TRATAMENTO DE UM PCD OCULAR, KIT PARA O TRATAMENTO DE RETINITE PIGMENTOSA, MÉTODO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE UM COMPOSTO ÚTIL PARA O TRATAMENTO DE UM INDIVÍDUO QUE TEM UM PCD OCULAR, MÉTODO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE UM COMPOSTO ÚTIL PARA O TRATAMENTO DE UM INDIVÍDUO QUE TEM RETINITE PIGMENTOSA, USO DE UM INIBIDOR PROTEASSOMAL OU UM INIBIDOR DE AUTOFAGIA E MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE EM UMA CONFORMAÇÃO BIOQUIMICAMENTE FUNCIONAL A invenção caracteriza composições e métodos que são úteis para o tratamento ou a prevenção de uma doença de conformação de proteína em um indivíduo corrigindo as proteínas in vivo. Além disso, a invenção apresenta composições e métodos que são úteis para expressar uma proteína recombinante em uma conformação bioquimicamente funcional.

(30) Prioridade Unionista: 27/07/2005 US 60/703,068

(73) Titular(es): University Of Florida Research Foundation, Inc

(72) Inventor(es): Shalesh Kaushal, Syed Mohammed Noorwez

(74) Procurador(es): David do Nascimento Advogados Associados

(86) Pedido Internacional: PCT US06029402 de 27/07/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/014327 de 01/02/2007

USO DE UM COMPOSTO SELECIONADO DO GRUPO QUE
CONSISTE EM UM INIBIDOR PROTEASSOMAL, UM INIBIDOR DE
AUTOFAGIA, UM INIBIDOR LISOSSOMAL, UM INIBIDOR DO TRANSPORTE
DE PROTEÍNA DO ER AO GOLGI, UM INIBIDOR DE CHAPERONINA HSP90,
5 UM ATIVADOR DA RESPOSTA A CHOQUE TÉRMICO, UM INIBIDOR DE
GLICOSIDASE, E UM INIBIDOR DE HISTONA DEACETILASE, USO DE 11-
CIS-RETINAL OU 9-CIS-RETINAL E UM COMPOSTO SELECIONADO DO
GRUPO QUE CONSISTE EM UM INIBIDOR PROTEASSOMAL, UM INIBIDOR
DE AUTOFAGIA, UM INIBIDOR LISSOSOMAL, UM INIBIDOR DO
10 TRANSPORTE DE PROTEÍNA DO ER AO GOLGI, UM INIBIDOR DE
CHAPERONINA HSP90, UM ATIVADOR DE RESPOSTA A CHOQUE TÉRMICO,
UM INIBIDOR DE GLICOSIDASE, E UM INIBIDOR DE HISTONA
DEACETILASE, MÉTODO PARA AUMENTAR A QUANTIDADE DE UM
CONFORMAÇÃO BIOQUIMICAMENTE FUNCIONAL DE UMA PROTEÍNA EM UMA
15 CÉLULA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE UM PCD
OCULAR, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE RETINITE
PIGMENTOSA, KIT PARA O TRATAMENTO DE UM PCD OCULAR, KIT PARA
O TRATAMENTO DE RETINITE PIGMENTOSA, MÉTODO PARA A
IDENTIFICAÇÃO DE UM COMPOSTO ÚTIL PARA O TRATAMENTO DE UM
20 INDIVÍDUO QUE TEM UM PCD OCULAR, MÉTODO PARA A IDENTIFICAÇÃO
DE UM COMPOSTO ÚTIL PARA O TRATAMENTO DE UM INDIVÍDUO QUE TEM
RETINITE PIGMENTOSA, USO DE UM INIBIDOR PROTEASSOMAL OU UM
INIBIDOR DE AUTOFAGIA E MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA
PROTEÍNA RECOMBINANT EM UMA CONFORMAÇÃO BIOQUIMICAMENTE
25 FUNCIONAL

REFERÊNCIA REMISSIVA A PEDIDOS CORRELATOS

O presente pedido de patente reivindica o benefício
do seguinte Pedido de Patente Norte-americano Provisório U.S.
nº. 60/703.068, o qual foi depositado em 27 de julho de 2005,
30 cujo conteúdo é incorporado na presente invenção a título de
referência.

DÉCLARAÇÃO DE DIREITOS ÀS INVENÇÕES ELABORADAS SOB PESQUISA
PATROCINADA PELO GOVERNO

O presente trabalho foi suportado por uma Concessão do National Eye Institute, a Concessão n°. EY016070-01. O governo pode ter determinados direitos sobre a invenção.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

5 As proteínas devem se dobrar em sua conformação tridimensional correta para atingir a sua função biológica. A conformação nativa de um polipeptídeo é codificada dentro de sua seqüência de aminoácido primária e até mesmo uma única mutação em uma seqüência de aminoácido pode prejudicar a

10 capacidade de uma proteína de atingir a sua conformação apropriada. Quando as proteínas não se dobram corretamente, os efeitos biológicos e clínicos podem ser devastadores. A agregação e o dobramento incorreto da proteína são os principais contribuintes para muitas doenças humanas, tais

15 como a retinite pigmentosa autossomal dominante, o mal de Alzheimer, a deficiência de α 1-antitripsina, a fibrose cística, o diabetes nefrogênico insípido e as infecções mediadas por príons. A doença pode resultar de deficiências no nível de uma proteína cuja função seja requerida em um

20 caminho bioquímica particular, tal como na fibrose cística, onde as mutações no regulador de condutância de membrana da fibrose cística (CFTR), um canal de cloreto ativado por CAMP expresso na membrana apical das células epiteliais, afetam a sua capacidade de serem produzidas, processadas e

25 direcionadas à membrana plasmática, onde a sua função é requerida. Em outros distúrbios de dobramento incorreto de proteína, a doença resulta por causa dos efeitos citotóxicos da proteína mal-dobrada, tal como no mal de Alzheimer onde a agregação de placas amilóides causa danos neuronais.

30

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

A invenção apresenta composições e métodos que são úteis para o tratamento ou a prevenção de uma Doença de Conformação de Proteína ao corrigir as proteínas mal-dobradas

in vivo, e métodos para intensificar a expressão de proteínas recombinantes em uma célula eucariótica, onde a proteína recombinante é expressa em uma conformação bioquimicamente funcional.

5 Em um aspecto, a invenção apresenta de maneira geral métodos para o tratamento de um indivíduo (por exemplo, um mamífero, tal como um ser humano) que tem um distúrbio de conformação de proteína (PCD) (por exemplo, deficiência de α 1-antitripsina, fibrose cística, mal de Huntington, mal de
10 Parkinson, mal de Alzheimer, diabetes nefrogênico insípido, câncer e mal de Jacob-Creutzfeld). O método envolve a administração de um ou mais dos seguintes compostos: um inibidor proteassomal, um inibidor de autofagia, um inibidor lisossomal, um inibidor do transporte de proteínas do RE ao
15 Golgi, um inibidor do protetor de Hsp90, um ativador da resposta a choque térmico, um inibidor de glicosidase e um inibidor de desacetilase de histona, em que o composto é administrado em uma quantidade suficiente para tratar o indivíduo. Em uma realização, o PCD é um PCD ocular
20 selecionado do grupo que consiste em retinite pigmentosa, degeneração macular relacionada com a idade, glaucoma, distrofias corneais, retinosquise, mal de Stargardt, gânglios autossomais dominantes, e distrofia macular de Best. Em uma outra realização, o método envolve adicionalmente a
25 administração de 11-cis-retinal, 9-cis-retinal ou um isômero travado de sete anéis de 11-cis-retinal ao indivíduo. A combinação de pelo menos um desses compostos e 11-cis-retinal, 9-cis-retinal ou um isômero travado de sete anéis de 11-cis-retinal é particularmente útil para o tratamento da
30 retinite pigmentosa e da degeneração macular relacionada com a idade.

Em outras realizações, onde o PCD é a fibrose cística, o método envolve adicionalmente a administração de

um agente selecionado do grupo que consiste em antibióticos, vitaminas A, D, E e suplementos de K, bronquiodilatação com albuterol, dornase e ibuprofeno; em que o PCD é o mal de Huntington, o método envolve adicionalmente a administração

5 de um agente selecionado do grupo que consiste em haloperidol, fenotiazina, reserpina, tetrabenazina, amantadina e co-enzima Q10; onde o PCD é o mal de Parkinson, o método envolve adicionalmente a administração de um agente selecionado do grupo que consiste em levodopa, amantadina,

10 bromocriptina, pergolida, apomorfina, benserazida, lisurida, mesulergina, lisurida, lergotrila, memantina, metergolina, piribedila, tiramina, tirosina, fenilalanina, mesilato de bromocriptina, mesilato de pergolida, anti-histamínicos, antidepressivos e inibidores da oxidase de monoamina; onde o

15 PCD é o mal de Alzheimer, o método envolve adicionalmente a administração de um agente selecionado do grupo que consiste em donepezil, rivastigmina, galantamina e tacrina; onde o PCD é o diabetes nefrogênico insípido o método envolve adicionalmente a administração de um agente selecionado do

20 grupo que consiste em clorotiazida/hidroclorotiazida, amilorida e indometacina; e onde o PCD é o câncer, o método envolve adicionalmente a administração de um agente selecionado do grupo que consiste em acetato de abiraterona, altretamina, anidrovinblastina, auristatina, bexaroteno,

25 bicalutamida, BMS184476, 2,3,4,5,6-pentafluoro-N-(3-fluoro-4-metoxifenil)benzeno sulfonamida, bleomicina, N,N-dimetil-L-valil-L-valil-N-metil-L-valil-L-prolil-1-L-prolin-t-butilamida, caquectina, cemadotina, clorambucil, ciclofosfamida,

30 caleucoblastina, docetaxol, doxetaxel, carboplatina, carmustina (BCNU), cisplatina, criptoficina, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina (DTIC), dactinomicina, daunorubicina, dolastatina, doxorubicina (adriamicina), etoposide, 5-

fluorouracila, finasterida, flutamida, hidroxiuréia e hidroxiureiataxanos, ifosfamida, liarozol, lonidamina, lomustina (CCNU), mecloretamina (mostarda de nitrogênio), melfalano, isetionato de mivobulina, rizoxina, sertenef, estreptozocina, mitomicina, metotrexato, nilutamida, onapristona, paclitaxel, prednimustina, procarbazona, RPR109881, fosfato de estramustina, tamoxifeno, tasonermina, taxol, tretinoína, vinblastina, vincristina, sulfato de vindesina e vinflunina.

10 Em um aspecto correlacionado, a invenção apresenta um método para o tratamento de um indivíduo diagnosticado como portador de retinite pigmentosa. O método envolve a administração ao indivíduo de 11-cis-retinal ou 9-cis-retinal; e a administração de pelo menos um composto
15 adicional selecionado do grupo que consiste em: um inibidor proteassomal, um inibidor de autofagia, um inibidor lisossomal, um inibidor do transporte de proteínas do RE ao Golgi, um inibidor do protetor de Hsp90, um ativador da resposta ao choque térmico, um inibidor de glicosidase e um
20 inibidor de desacetilase de histona, onde 11-cis-retinal ou 9-cis-retinal e o composto são administrados simultaneamente ou dentro de quatorze dias entre as administrações em quantidades suficientes para tratar o indivíduo.

Em várias realizações dos aspectos acima, 11-cis-retinal ou 9-cis-retinal e o composto são administrados
25 dentro de vinte e quatro horas entre as administrações, dentro de cinco, dez ou quatorze dias entre as administrações; ou são administrados simultaneamente. Em outras realizações dos aspectos acima, 11-cis-retinal ou 9-cis-retinal e o composto são administrados ao olho (por
30 exemplo, intra-ocularmente). Em outras realizações dos aspectos acima, 11-cis-retinal ou 9-cis-retinal e o composto são incorporados em uma composição que confere a liberação a

longo prazo (por exemplo, uma microesfera, uma nanoesfera ou uma nanoemulsão) ou a sua liberação a longo prazo é obtida mediante o uso de um dispositivo de aplicação de droga. Em outras realizações dos aspectos acima, o método compreende
5 adicionalmente a administração de um suplemento de vitamina A.

Contudo, em um outro aspecto, a invenção apresenta um método para aumentar a quantidade de uma conformação bioquimicamente funcional de uma proteína em uma célula. O
10 método envolve a colocação de uma célula em contato com uma quantidade eficaz de pelo menos um composto selecionado do grupo que consiste em: um inibidor proteassomal, um inibidor de autofagia, um inibidor lisossomal, um inibidor do transporte de proteínas do RE ao Golgi, um inibidor do
15 protetor de Hsp90, um ativador da resposta ao choque térmico, um inibidor de glicosidase e um inibidor de desacetilase de histona; e a identificação de um aumento na quantidade de uma conformação bioquimicamente funcional da proteína. Em uma realização, o método envolve adicionalmente a colocação da
20 célula em contato com 11-cis-retinal, 9-cis-retinal ou um isômero travado de sete anéis de 11-cis-retinal. Em uma outra realização, a célula (por exemplo, uma célula de mamífero ou humana *in vitro* ou *in vivo*) compreende uma proteína mutante (por exemplo, opsina, miocilina, lipofuscina, β igH3) que
25 forma um agregado ou uma proteína de fibrila.

Contudo, em um outro aspecto, a invenção apresenta uma composição farmacêutica para o tratamento de um PCD ocular que compreende uma quantidade eficaz de 11-cis-retinal ou de 9-cis-retinal e uma quantidade eficaz de pelo menos um
30 composto adicional selecionado do grupo que consiste em um inibidor proteassomal, um inibidor de autofagia, um inibidor lisossomal, um inibidor do transporte de proteínas do RE ao Golgi, um inibidor do protetor de Hsp90, um ativador da

resposta ao choque térmico, um inibidor de glicosidase e um inibidor de desacetilase de histona em um excipiente farmacêuticamente aceitável.

Contudo, em um outro aspecto, a invenção apresenta
5 uma composição farmacêutica para o tratamento da retinite pigmentosa que compreende uma quantidade eficaz de 11-cis-retinal ou de 9-cis-retinal e uma quantidade eficaz de pelo menos um composto adicional selecionado do grupo que consiste em um inibidor proteassomal, um inibidor de autofagia, um
10 inibidor lisossomal, um inibidor do transporte de proteínas do RE ao Golgi, um inibidor do protetor de Hsp90, um ativador da resposta ao choque térmico, um inibidor de glicosidase e um inibidor de desacetilase de histona em um excipiente farmacêuticamente aceitável.

15 Em um outro aspecto, a invenção apresenta um kit para o tratamento de um PCD ocular. O kit inclui uma quantidade eficaz de 11-cis-retinal ou de 9-cis-retinal e uma quantidade eficaz de pelo menos um composto adicional selecionado do grupo que consiste em um inibidor
20 proteassomal, um inibidor de autofagia, um inibidor lisossomal, um inibidor do transporte de proteínas do RE ao Golgi, um inibidor do protetor de Hsp90, um ativador da resposta ao choque térmico, um inibidor de glicosidase e um inibidor de desacetilase de histona.

25 Contudo, em um outro aspecto, a invenção apresenta um kit para o tratamento da retinite pigmentosa. O kit inclui uma quantidade eficaz de 11-cis-retinal ou de 9-cis-retinal e uma quantidade eficaz de pelo menos um composto adicional selecionado do grupo que consiste em um inibidor
30 proteassomal, um inibidor de autofagia, um inibidor lisossomal, um inibidor do transporte de proteínas do RE ao Golgi, um inibidor do protetor de Hsp90, um ativador da

resposta ao choque térmico, um inibidor de glicosidase e um inibidor de desacetilase de histona.

Contudo, em um outro aspecto, a invenção caracteriza um método para a identificação de um composto
5 útil para tratar um indivíduo que tem um PCD ocular. O método envolve a colocação de uma célula *in vitro* que expressa a proteína mal-dobrada em contato com um composto candidato; e a determinação do rendimento da proteína corretamente dobrada recuperada a partir da célula em relação a uma célula de
10 controle, onde um aumento no rendimento da proteína corretamente dobrada na célula contatada identifica um composto útil para tratar um indivíduo que tem um PCD.

Contudo, em um outro aspecto, a invenção apresenta um método para a identificação de um composto útil para
15 tratar um indivíduo que tem retinite pigmentosa. O método envolve a colocação de uma célula que expressa a proteína mal-dobrada *in vitro* em contato com (i) 11-cis-retinal ou 9-cis-retinal e (ii) em um composto candidato; e a determinação do rendimento da proteína corretamente dobrada recuperada a
20 partir da célula relativa a uma célula de controle, onde um aumento no rendimento da proteína corretamente dobrada na célula contatada identifica um composto útil para tratar um indivíduo que tem a retinite pigmentosa. Em uma realização, a proteína mal-dobrada (por exemplo, opsina) compreende uma
25 mutação (tal como uma mutação de P23H).

Contudo, em um outro aspecto, a invenção apresenta um método para o tratamento de um indivíduo que tem um distúrbio de conformação de proteína (PCD). O método envolve a administração ao indivíduo de um inibidor proteassomal ou
30 de um inibidor de autofagia em quantidades suficientes para tratar o indivíduo.

Contudo, em um outro aspecto, a invenção apresenta um método para o tratamento de um indivíduo que tem retinite

pigmentosa. O método envolve a administração ao indivíduo de um inibidor proteassomal ou de um inibidor de autofagia (por exemplo, 3-metiladenina) em quantidades suficientes para tratar o indivíduo. Em uma realização, o inibidor proteassomal é um inibidor reversível do proteassomo (por exemplo, MG132). Em uma outra realização, o inibidor de autofagia é selecionado do grupo que consiste em 3-metiladenina, 3-metil adenosina, adenosina, ácido ocadáico, N⁶-ribosídeo de mercaptopurina (N⁶-MPR), análogo de adenosina aminotiolado, ribosídeo de 5-amino-4-imidazol carboxamida (AICAR) e bafilomicina A1.

Contudo, em um outro aspecto, a invenção apresenta um método para a produção de uma proteína recombinante em uma conformação bioquimicamente funcional. O método envolve a colocação de uma célula (por exemplo, uma célula eucariótica, uma célula de levedura, uma célula de mamífero) que expressa a proteína recombinante em contato com um composto selecionado do grupo que consiste em um inibidor proteassomal, um inibidor de autofagia, em um inibidor lisossomal, um inibidor do transporte de proteínas do RE ao Golgi, um inibidor do protetor de Hsp90, um ativador da resposta ao choque térmico, um inibidor de glicosidase e um inibidor de desacetilase de histona; e o isolamento da proteína recombinante da célula, onde o método produz uma proteína recombinante em uma conformação bioquimicamente funcional. Em uma realização, o método envolve adicionalmente a medição da atividade biológica da proteína. Em uma outra realização, a atividade biológica é detectada utilizando um ensaio enzimático ou então espectrofotometricamente. Em uma outra realização, o método envolve adicionalmente a colocação da célula em contato com 11-cis-retinal (por exemplo, um isômero travado de sete anéis de 11-cis-retinal).

Em várias realizações de qualquer um dos aspectos acima, o inibidor proteassomal (por exemplo, um inibidor reversível do proteassomo) é qualquer um ou mais de MG 132, lactocistina, clasto-lactocistina-beta-lactona, PSI, MG-115, 5 MG-101, N-Acetil-Leu-Leu-Met-CHO, N-carbobenzoil-Gly-Pro-Phe-Leu-CHO, N-carbobenzoil-Gly-Pro-Ala-Phe-CHO, N-carbobenzoil-Leu-Leu-Phe-CHO, e os sais ou análogos dos mesmos; o inibidor de autofagia é um ou mais de 3-metiladenina, 3-metiladenosina, adenosina, ácido ocadáico, ribosídeo de N⁶-mercaptopurina (N⁶-MPR), ribosídeo de 5-amino-4-imidazolcarboxamida (AICAR), bafilomicina A1, e os sais ou análogos dos mesmos; o inibidor lisossomal é um ou mais entre leupeptina, trans-epoxisacinil-L-leucilamida-(4-guanidino)-butano, éster metílico de L-metionina, cloreto de amônio, 15 metilamina, cloroquina, e os sais ou análogos dos mesmos; o inibidor do transporte de proteínas do RE ao Golgi é a brefeldina A, e os sais ou análogos dos mesmos; o inibidor do protetor de Hsp90 é um ou mais dos antibióticos dentre ansamicina benzoquinona, Geldanamicina, 17-alilamino-17-20 demetoxigeldanamicina, radicicol, novobiocina e um inibidor Hsp90 que se ligue à cavidade de ATP/ADP de Hsp90, e os sais ou análogos dos mesmos; o ativador da resposta ao choque térmico é selecionado do grupo que consiste em celastrol, éster metílico de celastrol, diacetato de diidrocelastrol, 25 éster butílico de celastrol e diidrocelastrol; o inibidor de glicosidase é qualquer um ou mais entre cloridreto de australina, castanoespermina, 6-acetamido-6-deoxicastanoespermina, cloridreto de deoxifuconojirimicina (DFJ), deoxinojirimicina (DNJ), cloridreto de 30 deoxigalactonojirimicina (DGJ), cloridreto de deoximannojirimicina (DMJ), 2R,5R-Bis(hidroximetil)-3R,4R-diidróxi pirrolidina (DMDP), cloridreto de 1,4-dideóxi-1,4-imino-D-manitol, cloridreto de 3R,4R,5R,6R)-3,4,5,6-

tetraidrôxi azepano, 1,5-dideoxi-1,5-imino-xilitol, cifunensina, N-butildeoxinojirimicina (BDNJ), N-nonil DNJ (NDNJ), n-hexil DNJ (HDNJ), N-metildeoxinojirimicina (MDNJ), e os sais ou análogos dos mesmos; o inibidor de desacetilase de histona é qualquer um ou mais entre Scriptaid, Composto 8 APHA, Apicidina, butirato de sódio, (-)-Depudecina, Sirtinol, tricostatina A, e os sais ou análogos dos mesmos. Em várias realizações de qualquer um dos aspectos acima, o PCD ocular é qualquer condição entre degeneração macular relacionada com a idade, retinite pigmentosa, glaucoma, distrofias corneais, retinosquise, mal de Stargardt, gânglios autossomais dominantes ou distrofia macular de Best, ou qualquer outra doença ocular caracterizada pela deposição de agregados ou de fibrilas da proteína dentro de uma célula do olho. Em vários aspectos, a proteína mutante que forma esses agregados ou fibrilas inclui a opsina, a miocilina, a lipofuscina ou *BIGH3βigH3*. Em outras realizações de qualquer um dos aspectos acima, o tema compreende uma mutação que afeta o dobramento da proteína (por exemplo, uma mutação em uma opsina, tal como uma mutação de P23H).

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

As Figuras 1A e 1B são espectros de absorbância que mostram o efeito de MG132 e de 11-cis-retinal na absorbância do mutante P23H e da rodopsina do tipo selvagem, respectivamente.

As Figuras 2A e 2B são espectros de absorbância que mostram o efeito de 3-metiladenina e de 11-cis-retinal na absorbância do mutante P23H e da rodopsina do tipo selvagem.

As Figuras 3A e 3B são espectros de absorbância que mostram o efeito do cloreto de amônio e de 11-cis-retinal na absorbância do mutante P23H e da rodopsina do tipo selvagem.

As Figuras 4A e 4B são espectros de absorbância que mostram o efeito da brefeldina A e de 11-cis-retinal na absorbância do mutante P23H e da rodopsina do tipo selvagem.

5 As Figuras 5A e 5B são espectros de absorbância que mostram o efeito de Geldanamicina e de 11-cis-retinal na absorbância do mutante P23H e da rodopsina do tipo selvagem.

As Figuras 6A e 6B são espectros de absorbância que mostram o efeito de Celastrol e de 11-cis-retinal na absorbância do mutante P23H e da rodopsina do tipo selvagem.

10 As Figuras 7A e 7B são espectros de absorbância que mostram o efeito de diidro-celastrol e de 11-cis-retinal na absorbância do mutante P23H e da rodopsina do tipo selvagem.

As Figuras 8A e 8B são espectros de absorbância que mostram o efeito de Scriptaid e de 11-cis-retinal na absorbância do mutante P23H e da rodopsina do tipo selvagem.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Definições

Por "doença conformacional de proteína" entenda-se uma doença ou um distúrbio cuja patologia esteja relacionada à presença de uma proteína mal-dobrada. Em uma realização, uma doença conformacional de proteína é cautilizada quando a proteína mal-dobrada interfere na atividade biológica normal de uma célula, um tecido ou um órgão.

25 Por "inibidor proteassomal" entenda-se um composto que reduz uma atividade proteassomal, tal como a degradação de uma proteína ubiquinada.

Por "inibidor de autofagia" entenda-se um composto que reduz a degradação de um componente celular por uma célula em que o componente reside.

30 Por "inibidor lisossomal" entenda-se um composto que reduz a digestão intracelular das macromoléculas por um lisossomo. Em uma realização, um inibidor lisossomal diminui a atividade proteolítica de um lisossomo.

Pelo "inibidor do transporte de proteína RE-Golgi" entenda-se um composto que reduz o transporte de uma proteína do RE ao Golgi ou do Golgi ao RE.

5 Por "inibidor do protetor de Hsp90" entenda-se um composto que reduz a atividade do protetor de Hsp90. Em uma realização, o inibidor altera a proteína que liga a uma cavidade de ATP/ADP de Hsp90.

10 Por "ativador da resposta ao choque térmico" entenda-se um composto que aumenta a atividade protetora ou a expressão de um componente da caminho de choque térmico. Os componentes da caminho de choque térmico incluem, mas sem ficar a eles limitados, Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 e elementos pequenos da família de HSP.

15 Por "inibidor de glicosidase" entenda-se um composto que reduz a atividade de uma enzima que divide uma ligação glicosídica.

Por "inibidor de desacetilase de histona" entenda-se um composto que reduz a atividade de uma enzima que desacetila uma histona.

20 Por "reduz" ou "aumenta" entenda-se uma alteração negativa ou positiva, respectivamente, de pelo menos 10%, 25%, 50%, 75% ou 100%.

25 Por "conformação bioquimicamente funcional" entenda-se uma proteína que tem uma estrutura terciária que permite que a proteína seja biologicamente ativa. Quando uma proteína mutante supõe uma conformação bioquimicamente funcional, a sua atividade biológica é aumentada. Conseqüentemente, uma proteína mutante que tem uma conformação bioquimicamente funcional pode, até certo grau, substituir funcionalmente uma proteína do tipo selvagem.

30

Métodos da Invenção

Em uma realização, a presente invenção apresenta métodos para o tratamento de uma doença e/ou distúrbios ou

sintomas da mesma, os quais compreendem a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição farmacêutica que compreende um composto das fórmulas na presente invenção a um indivíduo (por exemplo, um mamífero tal como um ser humano). Desse modo, uma realização apresenta um método para o tratamento de um indivíduo que sofre ou é suscetível a uma doença de conformação de proteína ou um distúrbio ou um sintoma da mesma. O método inclui a etapa de administração ao mamífero de uma quantidade terapêutica de uma quantidade de um composto na presente invenção suficiente para tratar a doença ou o distúrbio ou o sintoma da mesma, sob condições que a doença ou o distúrbio sejam tratados.

Os métodos na presente invenção incluem a administração ao indivíduo (incluindo um indivíduo identificado como estando com necessidade de tal tratamento) de uma quantidade eficaz de um composto descrito na presente invenção ou de uma composição descrita na presente invenção para produzir tal efeito. A identificação de um indivíduo com necessidade de tal tratamento pode residir no julgamento de um indivíduo ou de um profissional de cuidados com a saúde, e pode ser subjetiva (por exemplo, opinião) ou objetiva (por exemplo, mensurável por um método de teste ou de diagnóstico).

Conforme empregados na presente invenção, os termos "tratar", "que trata", "tratamento" e outros ainda referem-se à redução ou à melhoria de um distúrbio e/ou dos sintomas associados com o mesmo. Deve ser apreciado, embora não impossibilitado, que o tratamento de um distúrbio ou de uma condição não requeira que o distúrbio, a condição ou os sintomas associados com o mesmo sejam completamente eliminados.

Conforme empregados na presente invenção, os termos "impede", "que impede", "prevenção", "tratamento profilático"

e outros ainda referem-se à redução da probabilidade de desenvolver um distúrbio ou uma condição em um indivíduo, que não tenha, mas esteja em risco ou suscetível de desenvolver um distúrbio ou uma condição.

5 Os métodos terapêuticos da invenção (que incluem o tratamento profilático) em geral compreendem a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz dos compostos na presente invenção, tal como um composto das fórmulas na presente invenção a um indivíduo (por exemplo, animal,
10 humano) com necessidade do mesmo, incluindo um mamífero, particularmente um ser humano. Tal tratamento será administrado apropriadamente aos indivíduos, particularmente a seres humanos, que sofrem de, têm, são suscetíveis a ou estão em risco de ter uma doença, um distúrbio ou um sintoma
15 da mesma. A determinação desses indivíduos "em risco" pode ser feita por meio de qualquer determinação objetiva ou subjetiva por um teste de diagnóstico ou pela opinião de um indivíduo ou de um profissional de cuidados com a saúde (por exemplo, teste genético, marcador de enzima ou de proteína,
20 Marcador (tal como definido na presente invenção), histórico familiar, e outros ainda). Os compostos na presente invenção também podem ser utilizados no tratamento de quaisquer outros distúrbios em que o dobramento da proteína (incluindo o dobramento incorreto) possa estar implicado.

25 A invenção apresenta composições e métodos que são úteis para corrigir as proteínas mal-dobradas *in vivo*. As proteínas mal-dobradas podem interferir na função normal da célula e podem resultar em uma Doença Conformacional de Proteína (PCD) humana. As PCDs incluem a deficiência de □□-
30 antitripsina, fibrose cística, mal de Huntington, mal de Parkinson, mal de Alzheimer, diabetes nefrogênico insípido, câncer e distúrbios relacionados aos príons (por exemplo, o mal de Jacob-Creutzfeld). As composições e os métodos da

invenção são particularmente úteis para a prevenção ou o tratamento de PCDs oculares, incluindo a retinite pigmentosa, degeneração macular relacionada com a idade, glaucoma, distrofias corneais, retinosquise, mal de Stargardt, gânglios autossomais dominantes, distrofia macular de Best e distrofias corneais. As composições da invenção podem ser utilizadas para o tratamento da PCD, o retardamento da morte de células afetadas, o alívio dos sintomas causados pela PCD ou a prevenção de que uma PCD seja iniciada em primeiro lugar.

A invenção é geralmente baseada na descoberta que 11-cis-retinal em combinação com um inibidor proteassomal, um inibidor de autofagia, um inibidor lisossomal, um inibidor do transporte de proteínas do RE ao Golgi, um inibidor do protetor de Hsp90, um ativador da resposta ao choque térmico ou um inibidor de desacetilase de histona pode ser utilizado para corrigir a conformação da proteína opsina mal-dobrada ou para aumentar a quantidade de proteína corretamente dobrada em uma célula. Especificamente, o 11-cis-retinal em combinação com o inibidor proteassomal MG132, o inibidor de autofagia 3-metiladenina, o cloreto de amônio do inibidor lisossomal, o inibidor do transporte do RE-Golgi brefeldina A, o inibidor Geldanamicina Hsp90, o ativador da resposta ao choque térmico Celastrol ou o inibidor de desacetilase de histona Scriptaid permitiram que uma proteína de opsina do mutante P23H assumisse uma conformação bioquimicamente funcional e se associasse com 11-cis-retinal para formar a rodopsina. Além disso, o inibidor proteassomal MG132 e o inibidor autofágico de 3-metil adenina foram utilizados independentemente para corrigir a conformação de opsina do mutante P23H e permitir que formasse a rodopsina.

Inibidores Proteassomais

O proteassomo 26S é uma protease multicatalítica que divide as proteínas ubiquinadas em peptídeos curtos. Os inibidores proteassomais são uma classe de compostos que podem ser utilizados independentemente ou em combinação com 11-cis-retinal, 9-cis-retinal ou um isômero travado de sete anéis de 11-cis-retinal para o tratamento de PCD. MG-132 é um inibidor proteassomal que pode ser utilizado independentemente ou em combinação com 11-cis-retinal, 9-cis-retinal ou um isômero travado de sete anéis de 11-cis-retinal. MG-132 é particularmente útil para o tratamento da retinite pigmentosa e outras doenças oculares relacionadas à agregação de proteínas ou ao dobramento incorreto de proteínas. Outros inibidores proteassomais úteis nos métodos da invenção incluem a lactocistina (LC), clasto-lactocistina-beta-lactona, PSI (N-carbobenzoil-Ile-Glu-(OtBu)-Ala-Leu-CHO), MG-132 (N-carbobenzoil-Leu-Leu-Leu-CHO). MG-115 (N-carbobenzoil-Leu-Leu-Nva-CHO), MG-101 (N-Acetyl-Leu-Leu-norLeu-CHO), ALLM (N-Acetyl-Leu-Leu-Met-CHO), N-carbobenzoil-Gly-Pro-Phe-Leu-CHO, N-carbobenzoil-Gly-Pro-Ala-Phe-CHO, N-carbobenzoil-Leu-Leu-Phe-CHO, e os sais ou análogos dos mesmos. Outros inibidores proteassomais e os seus usos são descritos por exemplo, na Patente U.S. Nº. 6.492.333.

Inibidores da Autofagia

A autofagia é um mecanismo evolucionariamente conservado para a degradação de componentes celulares no citoplasma e serve como um mecanismo de sobrevivência de células em células que estão no estado de inanição. Durante a autofagia, partes do citoplasma se tornam encapsuladas pelas membranas celulares, formando os vacúolos autofágicos que se fundem eventualmente com os lisossomos para terem os seus conteúdos degradados. Os inibidores de autofagia podem ser utilizados independentemente ou em combinação com 11-cis-retinal, 9-cis-retinal ou um isômero travado de sete anéis de

11-cis-retinal para o tratamento de PCD. O inibidor de autofagia 3-metil adenina é particularmente útil para o tratamento da retinite pigmentosa ou outras doenças oculares relacionadas a proteínas mal-dobradas ou à agregação de proteínas. Os inibidores da autofagia úteis nos métodos da invenção incluem, mas sem ficar a eles limitados, 3-metiladenina, 3-metil adenosina, adenosina, ácido ocadáico, ribosídeo de N^6 -mercaptopurina (N^6 -MPR), um análogo de adenosina aminotiolado, ribosídeo de 5-amino-4-imidazol do carboxamida (AICAR), bafilomicina A1, e os sais ou os análogos dos mesmos.

Inibidores Lisossomais

O lisossomo é um sítio principal de degradação celular da proteína. A degradação das proteínas que entram na célula pela endocitose mediada pelo receptor ou pela pinocitose e das proteínas da membrana plasmática ocorre nos lisossomos. Os inibidores lisossomais, tais como cloreto de amônio, leupeptina, trans-epoxisacinil-L-leucilamida-(4-guanidino) butano, éster metílico de L-metionina, cloreto de amônio, metilamina, cloroquina, e os sais ou análogos dos mesmos, são úteis em combinação com 11-cis-retinal, 9-cis-retinal ou um isômero travado de sete anéis de 11-cis-retinal para o tratamento de PCD.

Inibidores do Transporte do RE-Golgi

As proteínas recém sintetizadas entram na caminho secretória biossintética no RE. Para sair do RE, as proteínas devem ser corretamente dobradas. As proteínas que são mal-dobradas são retidas no RE. Os inibidores do transporte do RE-Golgi são úteis para o tratamento de PCD. A brefeldina A é um inibidor do transporte do RE-Golgi exemplificadora que é útil nos métodos da invenção.

Inibidores do Protetor de HSP90

A proteína de choque térmico 90 (Hsp90) é responsável por proteger as proteínas envolvidas na sinalização, proliferação e sobrevivência de células e é essencial para a estabilidade conformacional e para o funcionamento de uma série de proteínas. Os inibidores de Hsp-90 são úteis em combinação com 11-cis-retinal, 9-cis-retinal ou um isômero travado de sete anéis de 11-cis-retinal para o tratamento de PCD. Os inibidores de Hsp-90 incluem antibióticos de ansamicina benzoquinona, tais como a geldanamicina e 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina (17-AAG), que se ligam especificamente a Hsp90, alteram sua função e promovem a degradação proteolítica de proteínas do substrato. Outros inibidores de Hsp-90 incluem, mas sem ficar a eles limitados, radicicol, novobiocina e qualquer inibidor de Hsp90 que se ligue à cavidade de ATP/ADP de Hsp90.

Ativadores da Resposta ao Choque Térmico

O celastrol, um triterpeno de metídeo de quinona, ativa a resposta humana ao choque térmico. Em combinação com 11-cis-retinal, 9-cis-retinal ou um isômero travado de sete anéis de 11-cis-retinal, celastrol e outros ativadores da resposta ao choque térmico são úteis para o tratamento de PCD. Os ativadores da resposta ao choque incluem, mas sem ficar a eles limitados, celastrol, éster metílico de celastrol, diacetato de diidrocelastrol, éster butílico de celastrol, diidrocelastrol, e os sais ou os análogos dos mesmos.

Inibidores da Desacetilase de Histona

A regulação da expressão de genes é mediada por diversos mecanismos, incluindo as modificações pós-translacionais das histonas pela acetilação e desacetilação dinâmicas. As enzimas responsáveis pelos processos reversíveis de acetilação/desacetilação são acetiltransferases de histona (HATs) e desacetilases de

histona (HDACs), respectivamente. Os inibidores de desacetilase de histona incluem Scriptaid, Composto 8 APHA, Apicidina, butirato de sódio, (-)-Depudecina, Sirtinol, tricostatina A, e os sais ou análogos dos mesmos.

5 Inibidores de Glicosidase

Os inibidores de glicosidase são uma classe de compostos que são úteis para o tratamento de uma doença de conformação de proteína, particularmente quando administrados em combinação com 11-cis-retinal, 9-cis-retinal ou um isômero travado de sete anéis de 11-cis-retinal. A castanoespermina, que é um poliidroxi alcalóide isolado a partir de fontes de plantas, inibe a hidrólise enzimática do glicosídeo. A castanoespermina e seus derivados são particularmente úteis para o tratamento de um PCD, tal como a retinite pigmentosa. Também são úteis nos métodos da invenção outros inibidores de glicosidase, incluindo o cloridreto de australina, a 6-acetamido-6-deoxi-castanoespermina, que é um inibidor poderoso de hexosaminidases, o cloridreto de deoxifuconojirimicina (DFJ), a deoxinojirimicina (DNJ), que inibe a glicosidase I e II, o cloridreto de deoxigalactonojirimicina (DGJ), que inibe a α -D-galactosidase, o cloridreto de deoximannojirimicina (DMJ), a 2R,5R-bis(hidroximetil)-3R,4R-diidroxi pirrolidina (DMDP), também conhecida como 2,5-dideoxi-2,5-imino-D-manitol, o cloridreto de 1,4-dideoxi-1,4-imino-D-manitol, o cloridreto de 3R,4R,5R,6R)-3,4,5, 6-tetraidroxi azepano, que inibe a b-N-acetilglucosaminidase, o 1,5-dideoxi-1,5-imino-xilitol, que inibe a β -glicosidase e Cifunensina, um inibidor de manosidase 1. Também são úteis em combinação com 9-cis-retinal ou 11-cis-retinal N-butildeoxinojirimicina (BDNJ), N-nonil DNJ (NDNJ), N-hexil DNJ (HDNJ), N-metildeoxinojirimicina (MDNJ) e outros inibidores de glicosidase conhecidos no estado da técnica. Os inibidores de

glicosidase estão disponíveis comercialmente, por exemplo, junto à Industrial Research Limited (Wellington, Nova Zelândia) e os métodos de utilização são descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. N°. 4.894.388, 5.043.273, 5.103.008, 5.844.102 e 6.831.176; e na Publicação de Patente U.S. N°. 20020006909.

Distúrbios Oculares de Conformação de Proteínas

As composições da invenção são particularmente úteis para o tratamento de virtualmente qualquer distúrbio ocular de conformação de proteínas (PCD). Tais distúrbios são caracterizados pela acumulação de proteínas mal-dobradas como agregados de proteínas ou fibrilas dentro do olho. A retinite pigmentosa é um PCD ocular exemplificador que está associado com o dobramento incorreto de uma opsina (por exemplo, a opsina P23H) (N°. de Acesso no GenBank NM_000539 e NP_000530), bem como com mutações na anidrase carbônica IV (CA4) (N°. de Acesso no GenBank NM_000717 e NP_000708) (Rebello et al., Proc Acad Natl Sci EUA. 27 de abril de 2004; 101(17): 6617-22). CA4 é uma proteína ancorada em glicosilfosfatidilinositol que é altamente expressa nos coriocapilares do olho humano. Uma mutação de R14W faz com que a proteína CA4 seja dobrada incorretamente e os pacientes que portam essa mutação sofrem de retinite pigmentosa autossomal dominante. As composições da invenção que aumentam a quantidade de CA4 em uma conformação bioquimicamente funcional são úteis para o tratamento da retinite pigmentosa autossomal dominante associada com as mutações no polipeptídeo CA4.

A retinosquise juvenil ligada por X (RS) é um outro PCD ocular. A RS é uma causa comum de degeneração macular juvenil em homens. As mutações em RS1 (NM_000330, NP_000321) ou a retinosquesina, são responsáveis pela retinosquise ligada por X, uma degeneração macular comum de início precoce

em homens que resulta em uma divisão das camadas internas da retina e em perda grave de visão. As mutações em RS1 rompem o dobramento da proteína (J Biol Chem 18 de março de 2005; 280(11): 10721-30). As composições da invenção que aumentam a
5 quantidade de RS1 em uma conformação bioquimicamente funcional são úteis para o tratamento da retinosquise.

O glaucoma é um PCD ocular que está associado com as mutações na miocilina. A miocilina é uma glicoproteína secretada de função desconhecida que é expressa de maneira
10 onipresente em muitos órgãos humanos, incluindo o olho. As mutações na proteína miocilina causam uma forma de glaucoma, uma causa principal de cegueira em todo o mundo. As miocilinas mutantes se acumulam no retículo endoplasmático de células transfectadas como agregados insolúveis (Aroca-
15 Aguilar et al., Biol Chem. 3 de junho de 2005; 280(22): 21043-51; N°. de Acesso no GenBank NM_000261 e NP_000252). As composições da invenção que aumentam a quantidade de miocilina em uma conformação bioquimicamente funcional são úteis para o tratamento de glaucoma associado à miocilina.

20 A degeneração macular do tipo Stargardt é um PCD ocular que está associado com as mutações em ELOVL4. ELOVL4 (alongamento de ácidos graxos de cadeia muito longa 4) é um elemento da família ELO das proteínas envolvidas na biossíntese de ácidos graxos de cadeia muito longa. As
25 mutações em ELOVL4 foram identificadas em pacientes com degeneração macular do tipo Stargardt autossomal dominante (STGD3/adMD). As proteínas mutantes ELOVL4 se acumulam como agregados grandes dentro das células transfectadas (Grayson et al., J. Biol Chem. 21 de julho de 2005; Epub) (N°. de
30 Acesso no GenBank NM_022726 e NP_073563). As composições da invenção que aumentam a quantidade de ELOVL4 em uma conformação bioquimicamente funcional são úteis para o tratamento da degeneração macular do tipo Stargardt.

Oran

A Malattia Leventinese (ML) e a distrofia retinal de colméia de Doyme (DHRD) referem-se a dois PCDs autossomais dominantes que são caracterizados por depósitos amarelo-esbranquiçados conhecidos como gânglios que se acumulam abaixo do epitélio de pigmento retinal (RPE). O EFEMP1 desempenha um papel na formação de gânglios retinais e está envolvido na etiologia da degeneração macular (Stone et al., Nat Genet, junho de 1999 ; 22(2): 199-202) (Números de Acesso no GenBank NM_004105 e NP_004096). O mutante EFEMP1 é mal-dobrado e foi retido dentro das células. As composições da invenção que aumentam a quantidade de EFEMP1 em uma conformação bioquimicamente funcional são úteis para o tratamento de gânglios autossomais dominantes.

A distrofia macular de Best é um PCD autossomal dominante que é causada por mutações em VMD2 (hBEST1), que codifica a Bestrofina, canais de Cl(-) (Gomez et al., DNA Seq., dezembro de 2001; 12(5-6):431-5) (Números de Acesso no GenBank NM_004183 e NP_004174). Mutações na bestrofina provavelmente causam o dobramento incorreto da proteína. As composições da invenção que aumentam a quantidade de bestrofina corretamente dobrada são úteis para o tratamento da distrofia macular de Best.

As distrofias corneais ligadas a 5q31 são PCDs autossomais dominantes que são caracterizadas pela acumulação progressiva de depósitos de proteína dependente de idade na córnea seguida pela deficiência visual. Foi verificado que as mutações no gene *BIGH3* (Nº. de Acesso no GenBank: NM_000358), também denominadas *TGFBI* (fator de crescimento transformador induzido por $\square$.) são responsáveis por este grupo inteiro de condições. As substituições em Arg-124, assim como outros resíduos, resultam na deposição específica da córnea da proteína codificada (Nº. de Acesso no GenBank NP_000349) através de passagens de agregação distintos que envolvem o

turnover alterado da proteína no tecido corneal. As composições da invenção que aumentam a quantidade de proteína corretamente dobrada de TGFBI são úteis para o tratamento de distrofias corneais ligadas a 5q31.

5 Em uma realização, a invenção apresenta um método para monitorar o progresso do tratamento. O método inclui a etapa de determinação de um nível de marcador diagnóstico (Marcador) (por exemplo, qualquer alvo delineado na presente invenção modulado por um composto, uma proteína ou um

10 indicador do mesmo da presente invenção, etc.) ou a medição de diagnóstico (por exemplo, seleção, ensaio) em um indivíduo que sofre ou é suscetível a um distúrbio ou sintomas do mesmo associados com o dobramento da proteína (incluindo o dobramento incorreto), em que o indivíduo recebe uma

15 quantidade terapêutica de um composto na presente invenção suficiente para tratar a doença ou os sintomas da mesma. O nível do Marcador determinado no método pode ser comparado aos níveis conhecidos do Marcador em controles normais saudáveis ou em outros pacientes atingidos para estabelecer o

20 status da doença do indivíduo. Em realizações preferidas, um segundo nível do Marcador no indivíduo é determinado em um ponto de tempo posterior à determinação do primeiro nível e os dois níveis são comparados para monitorar o curso da doença ou a eficácia da terapia. Em determinadas realizações

25 preferidas, um nível de pré-tratamento do Marcador no indivíduo é determinado antes do início do tratamento de começo de acordo com a presente invenção; esse nível de pré-tratamento do Marcador pode então ser comparado ao nível do Marcador no indivíduo depois que o tratamento é iniciado,

30 para determinar a eficácia do tratamento.

Composições Farmacêuticas

A presente invenção apresenta preparados farmacêuticos que compreendem compostos conjuntamente com



veículos farmacêuticamente aceitáveis, em que os compostos propiciam a geração de uma proteína mutante em uma conformação bioquimicamente funcional. Tais preparados têm aplicações terapêuticas e profiláticas. Em uma realização, uma composição farmacêutica inclui 11-cis-retinal ou 9-cis-retinal em combinação com pelo menos um composto adicional que é um inibidor proteassomal, um inibidor de autofagia, um inibidor lisossomal, um inibidor do transporte de proteínas do RE ao Golgi, um inibidor do protetor de Hsp90, um ativador da resposta ao choque térmico, um inibidor de glicosidase ou um inibidor de desacetilase de histona. 11-cis-retinal ou 9-cis-retinal e o segundo composto são formulados juntos ou separadamente. Em uma outra realização, uma composição farmacêutica inclui um inibidor proteassomal ou um inibidor de autofagia. Os compostos da invenção podem ser administrados como parte de uma composição farmacêutica. As composições devem ser estéreis e devem conter uma quantidade terapeuticamente eficaz dos polipeptídeos em uma unidade de peso ou de volume apropriada para a administração a um indivíduo. As composições e as combinações da invenção podem fazer parte de um pacote farmacêutico, em que cada um dos compostos está presente em quantidades de dosagem individuais.

As composições farmacêuticas da invenção a serem utilizadas para a administração profilática ou terapêutica devem ser estéreis. A esterilidade é facilmente obtida através da filtração através das membranas de filtração estéreis (por exemplo, membranas com 0,2 μ m), pela irradiação gama ou por quaisquer outros meios apropriados conhecidos pelos elementos versados na técnica. As composições terapêuticas de polipeptídeo são colocadas geralmente em um recipiente que tem uma porta de acesso estéril, por exemplo, um saco ou frasco de solução intravenosa que tem um

bloqueador perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica. Essas composições serão normalmente armazenadas em recipientes unitários ou de doses múltiplas, por exemplo, ampolas ou frascos vedados, como uma solução aquosa ou como
5 uma formulação liofilizada para reconstituição.

Os compostos podem ser combinados, opcionalmente, com um excipiente farmacêuticamente aceitável. O termo "excipiente farmacêuticamente aceitável", tal como empregado na presente invenção, significa uma ou mais cargas sólidas ou
10 líquidas compatíveis, diluentes ou substâncias de encapsulação que são apropriadas para a administração a um ser humano. O termo "veículo" denota um ingrediente orgânico ou inorgânico, natural ou sintético, com o qual o ingrediente ativo é combinado para facilitar a administração. Os
15 componentes das composições farmacêuticas também podem ser misturados com as moléculas da presente invenção e entre si, de uma maneira tal que não haja nenhuma interação que prejudique substancialmente a eficácia farmacêutica desejada.

Os compostos da presente invenção podem ser
20 contidos em um excipiente farmacêuticamente aceitável. O excipiente contém de preferência quantidades menores de aditivos tais como as substâncias que intensificam a isotonicidade e a estabilidade química. Tais materiais são atóxicos aos receptores nas dosagens e concentrações
25 empregadas e incluem tampões tais como o fosfato, o citrato, o succinato, o acetato, o lactato, o tartarato, e outros ácidos orgânicos ou seus sais; tris-hidróxi metil aminometano (TRIS), bicarbonato, carbonato, e outras bases orgânicas e seus sais; antioxidantes, tais como o ácido ascórbico;
30 polipeptídeos com baixo peso molecular (por exemplo, menos de aproximadamente dez resíduos), por exemplo, poliarginina, polilisina, poliglutamato e poliaspartato; proteínas, tais como a albumina do soro, a gelatina ou as imunoglobulinas;

polímeros hidrofílicos, tais como a polivinil pirrolidona (PVP), polipropileno glicóis (PPGs) e polietileno glicóis (PEGs); aminoácidos, tais como a glicina, ácido glutâmico, ácido aspártico, histidina, lisina ou arginina; 5 monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos que incluem a celulose ou seus derivados, glicose, manose, sacarose, dextrinas ou derivados sulfatados de carboidrato, tais como a heparina, o sulfato de condroitina ou o sulfato de dextrano; íons de metais polivalentes, tais como íons de 10 metais divalentes que incluem íons de cálcio, íons de magnésio e íons de manganês; agentes quelantes, tais como o ácido etilenodiamina tetraacético (EDTA); álcoois de açúcar, tais como o manitol ou o sorbitol; contra-íons, tais como o sódio ou o amônio; e/ou tensoativos não-iônicos, tais como os 15 polissorbatos ou poloxâmeros. Outros aditivos também podem ser incluídos, tais como estabilizantes, antimicrobianos, gases inertes, reabastecedores de fluidos e de nutrientes (isto é, dextrose de Ringer), reabastecedores de eletrólitos, e outros ainda, que podem estar presentes em quantidades 20 convencionais.

As composições, tal como descrito acima, podem ser administradas em quantidades eficazes. Uma quantidade eficaz irá depender do modo de administração, da condição particular que está sendo tratada e do resultado desejado. ela também 25 pode depender do estágio da condição, da idade e da condição física do indivíduo, da natureza da terapia simultânea, se tal existir, e de fatores similares conhecidos pelo clínico médico. Para aplicações terapêuticas, essa quantidade é suficiente para atingir um resultado medicamente desejável.

30 Com respeito a um indivíduo que tem uma doença ou um distúrbio de conformação de proteínas, uma quantidade eficaz é suficiente para aumentar o nível de uma proteína corretamente dobrada em uma célula. Com respeito a um

indivíduo que tem uma doença ou um distúrbio relacionado a uma proteína mal-dobrada, uma quantidade eficaz é uma quantidade suficiente para estabilizar, retardar ou reduzir um sintoma associado com uma patologia. Geralmente, as doses dos compostos da presente invenção devem ser de aproximadamente 0,01 mg/kg por dia a aproximadamente 1000 mg/kg por dia. Espera-se que doses que variam de aproximadamente 50 a aproximadamente 2000 mg/kg sejam apropriadas. Doses mais baixas irão resultar de determinados formas de administração, tal como a administração intravenosa. Caso uma resposta em um indivíduo seja insuficiente nas doses iniciais aplicadas, doses mais elevadas (ou doses eficazmente mais elevadas por uma via de aplicação mais localizada e diferente) podem ser empregadas até o ponto em que a tolerância do paciente permitir. Contempla-se que doses múltiplas por dia atingem os níveis sistêmicos apropriados de uma composição da presente invenção.

Uma variedade de vias de administração é disponível. Os métodos da invenção, falando de maneira geral, podem ser praticados utilizando qualquer modo de administração que seja medicamento aceitável, significando qualquer modo que produza níveis eficazes dos compostos ativos sem causar efeitos clinicamente adversos inaceitáveis. Em uma realização preferida, uma composição da invenção é administrada intra-ocularmente. Outros modos de administração incluem as vias oral, retal, tópica, intraocular, bucal, intravaginal, intracisternal, intracerebroventricular, intratraqueal, nasal, transdermal, implantes em/dentro ou a via parenteral. O termo "parenteral" inclui subcutâneo, intratecal, intravenoso, intramuscular, intraperitoneal ou infusão. As composições que compreendem uma composição da invenção podem ser adicionadas a um fluido fisiológico, tal

como o humor intravital. Para a administração ao SNC, uma variedade de técnicas está disponível para promover a transferência da terapêutica através da barreira hematoencefálica incluindo o rompimento por cirurgia ou por
5 injeção, drogas que transientemente abrem contato de aderência entre as células endoteliais da vasculatura do SNC e os compostos que facilitam a translocação através de tais células. A administração oral pode ser preferida para o tratamento profilático por causa da conveniência ao paciente
10 bem como pela programação de dosagem.

As composições farmacêuticas da invenção, opcionalmente, podem conter adicionalmente uma ou mais proteínas adicionais conforme desejado, incluindo proteínas do plasma, proteases e outro material biológico, contanto que
15 não cause efeitos adversos quando da administração a um indivíduo. As proteínas ou o material biológico apropriados podem ser obtidos do plasma humano ou de mamífero por qualquer um dos métodos de purificação conhecidos e disponíveis aos elementos versados na técnica; a partir de
20 sobrenadantes, extratos ou lisatos de cultura de tecido recombinante, vírus, levedura, bactérias ou similares que contêm um gene que expressa uma proteína humana ou de mamífero que é introduzida de acordo com técnicas de DNA recombinante padrão; ou a partir de líquidos biológicos
25 humanos (por exemplo, sangue, leite, linfa, urina ou similares) ou a partir de animais transgênicos que contêm um gene que expresse uma proteína humana que é introduzida de acordo com as técnicas transgênicas padrão.

As composições farmacêuticas da invenção podem
30 compreender um ou mais compostos de tamponamento do pH para manter o pH da formulação em um nível predeterminado que reflita o pH fisiológico, tal como na faixa de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,0. O composto de

tamponamento do pH utilizado na formulação líquida aquosa pode ser um aminoácido ou uma mistura de aminoácidos, tal como a histidina ou uma mistura de aminoácidos tais como a histidina e a glicina. Alternativamente, o composto de tamponamento do pH é de preferência um agente que mantém o pH da formulação em um nível predeterminado, tal como na faixa de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,0 e que não quelata os íons de cálcio. Os exemplos ilustrativos de tais compostos de tamponamento do pH incluem, mas sem ficar a eles limitados, íons de imidazol e de acetato. O composto de tamponamento do pH pode estar presente em qualquer quantidade apropriada para manter o pH da formulação em um nível predeterminado.

As composições farmacêuticas da invenção também podem conter um ou mais agentes de modulação osmótica, isto é, um composto que modula as propriedades osmóticas (por exemplo, a tonicidade, a osmolalidade e/ou a pressão osmótica) da formulação a um nível que seja aceitável à corrente sanguínea e às células sanguíneas de indivíduos receptores. O agente de modulação osmótica pode ser um agente que não quelata íons de cálcio. O agente de modulação osmótica pode ser qualquer composto conhecido ou disponível aos elementos versados na técnica para modular as propriedades osmóticas da formulação. O elemento versado na técnica pode determinar empiricamente a adequabilidade de um dado agente de modulação osmótica para o uso na formulação da invenção. Os exemplos ilustrativos de tipos apropriados de agentes de modulação osmótica incluem, mas sem ficar a eles limitados: sais, tais como o cloreto de sódio e o acetato de sódio; açúcares, tais como a sacarose, a dextrose e o manitol; aminoácidos, tal como a glicina; e as misturas de um ou de mais destes agentes e/ou tipos de agentes. O(s) agente(s) de modulação osmótica pode(m) estar presente(s) em

qualquer concentração suficiente para modular as propriedades osmóticas da formulação.

As composições que compreendem um composto da presente invenção podem conter íons de metais multivalentes, tais como íons de cálcio, íons de manganês e/ou íons de magnésio. Qualquer íon de metal multivalente que ajuda a estabilizar a composição e que não afeta adversamente os indivíduos receptores pode ser utilizado. O elemento versado na técnica, com base nesses dois critérios, pode determinar os íons de metal apropriados empiricamente, e as fontes apropriadas de tais íons de metal são conhecidas e incluem os sais inorgânicos e orgânicos.

As composições farmacêuticas da invenção também podem ser uma formulação líquida não-aquosa. Qualquer líquido não-aquoso apropriado pode ser empregado, contanto que propicie estabilidade aos agentes ativos contidos no mesmo. De preferência, o líquido não-aquoso é um líquido hidrofílico. Os exemplos ilustrativos de líquidos não-aquosos apropriados incluem: glicerol; sulfóxido de dimetila (DMSO); polidimetilsiloxano (PMS); etileno glicóis, tais como o etileno glicol, o dietileno glicol, o trietileno glicol, o polietileno glicol ("PEG") 200, PEG 300 e PEG 400; e os propileno glicóis, tais como o dipropileno glicol, o tripropileno glicol, o polipropileno glicol ("PPG") 425, PPG 725, PPG 1000, PPG 2000, PPG 3000 e PPG 4000.

As composições farmacêuticas da invenção também podem ser uma formulação líquida misturada aquosa/não-aquosa. Qualquer formulação líquida não-aquosa apropriada, tais como aquelas descritas acima, pode ser empregada junto com qualquer formulação líquida aquosa, tais como aquelas descritas acima, contanto que a formulação líquida misturada aquosa/não-aquosa propicie estabilidade ao composto contido na mesma. De preferência, o líquido não-aquoso em tal

formulação é um líquido hidrofílico. Os exemplos ilustrativos de líquidos não-aquosos apropriados incluem: glicerol; DMSO; PMS; etileno glicóis, tais como PEG 200, PEG 300 e PEG 400; e propileno glicóis, tais como PPG 425, PPG 725, PPG 1000, PPG 2000, PPG 3000 e PPG 4000.

As formulações estáveis apropriadas podem permitir a armazenagem dos agentes ativos em um estado líquido congelado ou descongelado. As formulações líquidas estáveis podem ser armazenadas a uma temperatura de pelo menos -70°C , mas também podem ser armazenadas a temperaturas mais elevadas de pelo menos 0°C ou entre aproximadamente 0°C e aproximadamente 42°C , dependendo das propriedades da composição. O elemento versado na técnica geralmente sabe que as proteínas e os polipeptídeos são sensíveis às mudanças no pH, na temperatura e em uma multiplicidade de outros fatores que podem afetar a eficácia terapêutica.

Em determinadas realizações, uma via de administração desejável pode ser efetuada por meio de aerossol pulmonar. As técnicas para a preparação dos sistemas de aplicação em aerossol que contêm polipeptídeos são bem conhecidas pelos elementos versados na técnica. Geralmente, tais sistemas devem utilizar componentes que não danifiquem significativamente as propriedades biológicas dos anticorpos, tais como a capacidade de ligação ao parátipo (vide, por exemplo, Sciarra e Cutie, "Aerosols," em Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edição, 1990, páginas 1694-1712; incorporado a título de referência). Os elementos versados na técnica podem modificar facilmente vários parâmetros e condições para produzir aerossóis de polipeptídeo sem recorrer à experimentação imprópria.

Outros sistemas de aplicação podem incluir sistemas de aplicação de liberação com o passar do tempo, de liberação retardada ou de liberação prolongada. Tais sistemas podem

evitar administrações repetidas das composições da invenção, aumentando a conveniência ao indivíduo e ao médico. Muitos tipos de sistemas de aplicação de liberação são disponíveis e conhecidos pelos elementos versados na técnica. Eles incluem

5 sistemas base de polímero tais como polilactídeos (Patente U.S. N°. 3.773.919; Patente Européia N°. 58.481), poli(lactídeo-glicolídeo), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, ácidos poli-hidróxi

10 butíricos, tal como o ácido poli-D-(-)-3-hidróxi butírico (Patente Européia N°. 133.988), copolímeros de ácido L-glutâmico e gama-etil-L-glutamato (Sidman, K. R. et al., Biopolymers 22:547-556), poli(metacrilato de 2-hidroetila) ou etileno acetato de vinila (Langer, R. et al., J. Biomed. Mater. Res. 15: 267-277; Langer, R. Chem. Tech. 12: 98-105) e

15 polianidretos. Outros exemplos de composições de liberação prolongada incluem matrizes de polímero semi-permeáveis na forma de artigos moldados, por exemplo, películas ou microcápsulas. Os sistemas de aplicação também incluem sistemas de não-polímeros que são: lipídeos que incluem

20 esteróis tais como o colesterol, os ésteres de colesterol e os ácidos graxos ou gorduras neutras tais como di- mono- e triglicerídeos; sistemas de liberação de hidrogel, tal como o hidrogel bio-reabsorvível derivado biologicamente (isto é, hidrogéis de quitina ou hidrogéis de quitosana); sistemas

25 silásticos; sistemas baseados em peptídeos; revestimentos de cera; tabletes comprimidos que utilizam aglutinantes e excipientes convencionais; implantes parcialmente fundidos; e outros ainda. Os exemplos específicos incluem, mas sem ficar a eles limitados: (a) sistemas erosionais em que o agente é

30 contido em uma forma dentro de uma matriz, tais como aquelas descritas nas Patentes U.S. N°. 4.452.775, 4.667.014, 4.748.034 e 5.239.660 e (b) sistemas difusionais em que um componente ativo permeia a uma taxa controlada a partir de um

polímero, tal como descrito nas Patentes U.S. N°. 3.832.253 e 3.854.480.

Um outro tipo de sistema de aplicação que pode ser utilizado com os métodos e as composições da invenção é um sistema de dispersão coloidal. Os sistemas de dispersão coloidal incluem sistemas baseados em lipídeos que incluem emulsões óleo-em-água, micelas, micelas misturadas e lipossomos. Os lipossomos são vasos artificiais da membrana, os quais são úteis como um vetor de aplicação *in vivo* ou *in vitro*. Os vasos unilamelares grandes (LUV), que variam no tamanho de 0,2 - 4,0 μ m, podem encapsular macromoléculas grandes dentro do interior aquoso e são aplicados às células em uma forma biologicamente ativa (Fraley, R. e Papahadjopoulos, D., Trends Biochem. Sci 6: 77-80).

Os lipossomos podem ser alvejados a um tecido particular ao acoplar o lipossomo a um ligando específico tal como um anticorpo, um açúcar, um glicolípídeo ou uma proteína monoclonal. Os lipossomos estão comercialmente disponíveis junto à Gibco BRL, por exemplo, como LIPOFECTINTM e LIPOFECTACETM, que são formados de lipídeos catiônicos tais como N-[1-(2,3-dioleilóxi)-propil]-N,N,N-cloreto de trimetilamônio (DOTMA) e dimetil brometo de dioctadecilamônio (DDAB). Os métodos para a elaboração de lipossomos são bem conhecidos no estado da técnica e foram descritos em muitas publicações, por exemplo, em DE 3.218.121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA) 82: 3688-3692 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA) 77: 4030-4034 (1980); EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949; EP 142.641; Pedido de Patente Japonês 83-118008; Patente U.S. N°. 4.485.045 e 4.544.545; e EP 102.324. Os lipossomos também foram revistos por Gregoriadis, G., Trends Biotechnol., 3: 235-241).

Um outro tipo de veículo é uma micropartícula ou um implante biocompatível que é apropriado para o implante no

receptor mamífero. Os implantes bioerodíveis exemplificadores que são úteis de acordo com este método são descritos no Pedido Internacional PCT N°. PCT/US/03307 (Publicação WO N°. 95/24929, intitulada "Polymeric Gene Delivery System").

5 PCT/US/0307 descreve matrizes poliméricas biocompatíveis, de preferência biodegradáveis para conter um gene exógeno sob o controle de um promotor apropriado. As matrizes poliméricas podem ser utilizadas para conseguir a liberação prolongada do gene ou do produto exógeno do gene no indivíduo.

10 A matriz polimérica está de preferência na forma de uma micropartícula tal como uma microesfera (em que um agente é disperso em toda uma matriz polimérica sólida) ou uma microcápsula (em que um agente é armazenado no núcleo de um escudo polimérico). As microcápsulas dos polímeros
15 antecedentes que contêm drogas são descritas, por exemplo, na Patente U.S. N°. 5.075.109. Outras formas de matriz polimérica para conter um agente incluem películas, revestimentos, géis, implantes e stents. O tamanho e a composição do dispositivo da matriz polimérica são
20 selecionados para resultar em cinética de liberação favorável no tecido em que a matriz é introduzida. O tamanho da matriz polimérica adicional é selecionado de acordo com o método de aplicação que deve ser utilizado. De preferência, quando uma via em aerossol é utilizada, a matriz polimérica e a
25 composição são abrangidas em um veículo tensoativo. A composição da matriz polimérica pode ser selecionada para ter ambas as taxas de degradação favoráveis e também ser formada de um material que seja bioaderente, para aumentar adicionalmente a eficácia de transferência. A composição da
30 matriz também pode ser selecionada para não se degradar, mas em vez disso, para ser liberada por meio de difusão durante um período de tempo prolongado. O sistema de aplicação também pode ser uma microesfera biocompatível que seja apropriada

para aplicação local específica de sítio. Tais microesferas são descritas em Chickering, D. E., et al., Biotechnol. Bioeng., 52: 96-101; Mathiowitz, E., et al., Nature 386: 410-414.

5 Ambas as matrizes poliméricas biodegradáveis e não-biodegradáveis podem ser utilizadas para aplicar as composições da invenção ao indivíduo. Tais polímeros podem ser polímeros naturais ou sintéticos. O polímero é selecionado com base no período de tempo em que a liberação é
10 desejada, geralmente da ordem de algumas horas a um ano ou mais. Tipicamente, a liberação durante um período que varia entre algumas horas e três a doze meses é a mais desejável. O polímero está opcionalmente na forma de um hidrogel que pode absorver até aproximadamente 90% de seu peso em água e
15 adicionalmente, é opcionalmente reticulado com íons multivalentes ou outros polímeros.

Os polímeros sintéticos exemplificadores que podem ser utilizados para formar o sistema de aplicação biodegradável incluem: poliamidas, policarbonatos,
20 polialquilenos, polialquileno glicóis, óxidos de polialquileno, tereftalatos de polialquileno, álcoois polivinílicos, éteres polivinílicos, ésteres polivinílicos, haletos polivinílicos, polivinil pirrolidona, poliglicolídeos, polissiloxanos, poliuretanos e co-polímeros
25 dos mesmos, alquil celulose, hidróxi alquil celulose, éteres de celulose, ésteres de celulose, nitrocelulose, polímeros de ésteres acrílicos e metacrílicos, metil celulose, etil celulose, hidróxi propil celulose, hidróxi propil metil celulose, hidróxi butil celulose, acetato de celulose,
30 propionato de celulose, acetato de butirato de celulose, acetato de ftalato de celulose, carbóxi etil celulose, triacetato de celulose, sal de sulfato de sódio de celulose, poli(metacrilato de metila), poli(metacrilato de etila),

poli(metacrilato de hexila), poli(metacrilato de isobutila),
poli(metacrilato de hexila), poli(metacrilato de isodecila),
poli(metacrilato de laurila), poli(metacrilato de fenila),
poli(acrilato de metila), poli(acrilato de isopropila),
5 poli(acrilato de isobutila), poli(acrilato de octadecila),
polietileno, polipropileno, poli(etileno glicol), óxido de
poli(etileno), tereftalato de poli(etileno), álcoois
poli(vinílicos), acetato de polivinínila, cloreto
polivinílico, poliestireno, polivinil pirrolidona e polímeros
10 de ácido láctico e de ácido glicólico, polianidridos,
poli(orto)éster, ácido poli(bútico), ácido poli(valérico) e
poli(lactídeo-cocaprolactona) e polímeros naturais tais como
o alginato e outros polissacarídeos que incluem o dextrano e
a celulose, colágeno, derivados químicos dos mesmos
15 (substituições, adições de grupos químicos, por exemplo,
alquila, alquilenos, hidroxilações, oxidações e outras
modificações feitas rotineiramente pelos elementos versados
na técnica), albumina e outras proteínas hidrofílicas, zeína
e outras prolamínas e proteínas hidrofóbicas, copolímeros e
20 misturas dos mesmos. Em geral, estes materiais se degradam
pela hidrólise ou pela exposição enzimática à água *in vivo*,
pela erosão da superfície ou em massa.

Métodos de Aplicação Ocular

As composições da invenção (por exemplo, inibidor
25 proteossomal, um inibidor de autofagia, um inibidor
lisossomal, um inibidor do transporte de proteínas do RE ao
Golgi, um inibidor do protetor de Hsp90, um ativador da
resposta ao choque térmico ou um inibidor de desacetilase de
histona) são particularmente apropriadas para o tratamento de
30 doenças oculares de conformação de proteínas, tais como o
glaucoma, a retinite pigmentosa, a degeneração macular
relacionada com a idade, distrofias corneais, a retinosquise,



o mal de Stargardt, gânglios autossomais dominantes e a distrofia macular de Best.

Em uma abordagem, as composições da invenção são administradas através de um dispositivo ocular apropriado para o implante direto no vítreo do olho. As composições da invenção podem ser fornecidas em composições de liberação prolongada, tais como aquelas descritas, por exemplo, nas Patentes U.S. N°. 5.672.659 e 5.595.760. Foi verificado que tais dispositivos propiciam uma liberação controlada e prolongada de várias composições para tratar o olho sem risco de efeitos colaterais locais e sistêmicos prejudiciais. Um objetivo do presente método ocular de aplicação é a maximização da quantidade de droga contida em um dispositivo ou em um implante intraocular ao minimizar seu tamanho a fim de prolongar a duração do implante. Vide, por exemplo, as Patentes U.S. N°. 5.378.475; 6.375.972 e 6.756.058 e as Publicações U.S. 20050096290 e 200501269448. Tais implantes podem ser implantes biocompatíveis e/ou biodegradáveis ou podem ser implantes não-biodegradáveis. Os implantes oculares biodegradáveis são descritos, por exemplo, na Publicação de Patente U.S. N°. 20050048099. Os implantes podem ser permeáveis ou impermeáveis ao agente ativo e podem ser introduzidos em uma câmara do olho, tais como as câmaras anterior ou posterior, ou podem ser implantados na esclera, no espaço transcoroidal ou na região avascularizada externa ao vítreo. Alternativamente, uma lente de contato que aja como um depósito para composições da invenção também pode ser utilizada para a aplicação da droga.

Em uma realização preferida, o implante pode ser posicionado sobre uma região avascular, tal como na esclera, para permitir a difusão transcleral da droga ao sítio de tratamento desejado, por exemplo, o espaço e a mácula intraocular do olho. Além disso, o sítio de difusão

transcleral fica de preferência na proximidade da mácula. Os exemplos de implantes para a aplicação de uma composição incluem, mas sem ficar a eles limitados, os dispositivos descritos nas Patentes U.S. N°. 3.416.530; 3.828.777; 5 4.014.335; 4.300.557; 4.327.725; 4.853.224; 4.946.450; 4.997.652; 5.147.647; 5.164.188; 5.178.635; 5.300.114; 5.322.691; 5.403.901; 5.443.505; 5.466.466; 5.476.511; 5.516.522; 5.632.984; 5.679.666; 5.710.165; 5.725.493; 5.743.274; 5.766.242; 5.766.619; 5.770.592; 5.773.019; 10 5.824.072; 5.824.073; 5.830.173; 5.836.935; 5.869.079; 5.902.598; 5.904.144; 5.916.584; 6.001.386; 6.074.661; 6.110.485; 6.126.687; 6.146.366; 6.251.090; e 6.299.895 e no pedido de patente WO 01/30323 e no pedido de patente WO 01/28474, os quais são incorporados na presente invenção a 15 título de referência.

Os exemplos incluem, mas sem ficar a eles limitados, os seguintes: um sistema de aplicação de droga de liberação prolongada que compreende um reservatório interno que compreende uma quantidade eficaz de um agente eficaz na 20 obtenção de um efeito fisiológico ou farmacológico local ou sistêmico desejado, um tubo interno impermeável à caminho do agente, sendo que o tubo interno tem uma primeira e segunda extremidades e cobre pelo menos uma porção do reservatório interno, sendo que o tubo interno é feito sob medida e é 25 formado de um material de modo que o tubo interno possa suportar seu próprio peso, um elemento impermeável posicionado na primeira extremidade do tubo interno, sendo que o elemento impermeável impede a caminho do agente para fora do reservatório através da primeira extremidade do tubo 30 interno e um elemento permeável posicionado na extremidade externa do tubo segundo, sendo que o elemento permeável permite a difusão do agente fora do reservatório através da extremidade interna do segundo tubo; um método para a



administração de um composto da invenção a um segmento de um olho, sendo que o método compreende a etapa de implante de um dispositivo de liberação prolongada para aplicar o composto da invenção ao vítreo do olho ou de um dispositivo implantável, liberação prolongada para a administração de um composto da invenção a um segmento de um olho; um dispositivo de liberação de droga prolongada que compreende: a) um núcleo da droga que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de pelo menos um primeiro agente eficaz na obtenção de um efeito diagnóstico ou eficaz na obtenção de um efeito fisiológico ou farmacológico local ou sistêmico desejado; b) pelo menos um copo unitário essencialmente impermeável à caminho do agente que cerca e define um compartimento interno para aceitar o núcleo da droga, sendo que o copo unitário compreende uma extremidade superior aberta com pelo menos um sulco de reentrância em torno de pelo menos uma porção da extremidade superior aberta do copo unitário; c) um plugue permeável que é permeável à caminho do agente, sendo que o plugue permeável é posicionado na extremidade superior aberta do copo unitário, sendo que o sulco interage com o plugue permeável mantendo-o em posição e fechando a extremidade superior aberta, o plugue permeável permite a caminho do agente fora do núcleo da droga, através do plugue permeável e para fora da extremidade superior aberta do copo unitário; e d) pelo menos um segundo agente eficaz na obtenção de um efeito diagnóstico ou eficaz na obtenção de um efeito fisiológico ou farmacológico local ou sistêmico desejado; ou um dispositivo de liberação de droga prolongada que compreende: um núcleo interno que compreende uma quantidade eficaz de um agente que tem uma solubilidade desejada e uma camada de revestimento do polímero, sendo que a camada do polímero é permeável ao agente, em que a camada de



revestimento do polímero cobre completamente o núcleo interno.

Outras abordagens para a aplicação ocular incluem o uso de lipossomos para alvejar um composto da presente invenção ao olho e de preferência às células epiteliais do pigmento retinal e/ou membrana de Brach. Por exemplo, o composto pode ser complexado com os lipossomos na maneira descrita acima e este complexo de composto/lipossomo é injetado em pacientes com uma doença ocular, utilizando a injeção intravenosa para dirigir o composto ao tecido ou à célula ocular desejada. A injeção direta do complexo do lipossomo em proximidade às células epiteliais do pigmento retinal ou à membrana de Brach também pode fornecer o alvejamento do complexo com algumas formas de PCD ocular. Em uma realização específica, o composto é administrado através de aplicação intraocular prolongada (tal como VITRASERT ou ENVISION). Em uma realização específica, o composto é aplicado por meio de injeção subtenons posterior. Em uma outra realização específica, as partículas de microemulsão que contêm as composições da invenção são aplicadas ao tecido ocular para a extração de lipídeos da membrana de Brach, das células epiteliais do pigmento retinal ou de ambas.

As nanopartículas constituem um sistema de veículo coloidal que foi demonstrado que melhora a eficácia da droga encapsulada ao prolongar a vida média do soro. As nanopartículas de cianoacrilatos de polialquila (PACAs) são um sistema coloidal de aplicação de droga do polímero que está em desenvolvimento clínico, tal como descrito por Stella et al., J. Pharm. Sci., 2000. 89: páginas 1452-1464; Brigger et al., Int. J. Pharm., 2001. 214: páginas 37-42; Calvo et al., Pharm. Res., 2001. 18: páginas 1157-1166; e Li et al., Biol. Pharm. Bull., 2001. 24: páginas 662-665. Os ácidos de poli(hidroxila) biodegradáveis, tais como os copolímeros de

poli(ácido láctico) (PLA) e de poli(glicolídeo láctico) (PLGA) estão sendo utilizados extensivamente em aplicações biomédicas e receberam a aprovação do FDA para determinadas aplicações clínicas. Além disso, as nanopartículas de PEG-PLGA têm muitas características de veículo desejáveis, inclusive (i) que o agente a ser encapsulado compreende uma fração razoavelmente elevada do peso (carregamento) do sistema de veículo total; (ii) que a quantidade de agente utilizada na primeira etapa do processo de encapsulação é incorporada no veículo final (a eficiência de captura) em um nível razoavelmente elevado; (iii) que o veículo pode ser congelado a seco e ser reconstituído na solução sem agregação; (iv) que o veículo é biodegradável; (v) que o sistema de veículo é de tamanho pequeno; e (vi) que o veículo intensifica a persistência das partículas.

As nanopartículas são sintetizadas utilizando virtualmente qualquer escudo biodegradável conhecido no estado da técnica. Em uma realização, um polímero, tal como poli (ácido láctico) (PLA) ou poli(ácido láctico-glicólico) (PLGA) é utilizado. Tais polímeros são biocompatíveis e biodegradáveis e estão sujeitos às modificações que aumentam desejavelmente a eficácia fotoquímica e o período de circulação da nanopartícula. Em uma realização, o polímero é modificado com um grupo terminal de ácido carboxílico (COOH) que aumenta a carga negativa da partícula e limita desse modo a interação com aptâmeros de ácido nucléico carregados negativamente. As nanopartículas também são modificadas com polietileno glicol (PEG), que também aumenta a vida média e a estabilidade das partículas em circulação. Alternativamente, o grupo COOH é convertido em um éster de N-hidróxi succinimida (NHS) para a conjugação covalente aos aptâmeros modificados por amina.

Os polímeros biocompatíveis úteis na composição e nos métodos da invenção incluem, mas sem ficar a eles limitados, poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, polialquileno glicóis, óxidos de polialquileno, tereftalatos de polialquileno, álcoois polivinílicos, éteres polivinílicos, ésteres polivinílicos, haletos polivinílicos, polivinil pirrolidona, poliglicolídeos, polissiloxanos, poliuretanos e copolímeros dos mesmos, alquil celulose, hidróxi alquil celulose, éteres de celulose, ésteres de celulose, nitrocelulose, polímeros de ésteres acrílicos e metacrílicos, metil celulose, etil celulose, hidróxi propil celulose, hidróxi propil metil celulose, hidróxi butil metil celulose, acetato de celulose, propionato de celulose, butirato de acetato de celulose, ftalato de acetato de celulose, carbóxi etil celulose, triacetato de celulose, sal de sódio de sulfato de celulose, poli(metacrilato de metila), poli(metacrilato de etila), poli(metacrilato de isobutila), poli(metacrilato de hexila), poli(metacrilato de isodecila), poli(metacrilato de laurila), poli(metacrilato de fenila), poli(acrilato de metila), poli(acrilato de isopropila), poli(acrilato de isobutila), poli(acrilato de octadecila), polietileno, polipropileno, poli(etileno glicol), óxido de poli(etileno), tereftalato de poli(etileno), álcoois poli(vinílicos), acetato poli(vinílico), cloreto polivinílico, poliestireno, polivinil pirrolidona, ácidos poliialurônicos, caseína, gelatina, glutina, polianidridos, ácido poliacrílico, alginato, quitosana, poli(metacrilato de metila), poli(metacrilato de etila), poli(metacrilato de butila), poli(metacrilato de isobutila), poli(metacrilato de hexila), poli(metacrilato de isodecila), poli(metacrilato de laurila), poli(metacrilatode fenila), poli(acrilato de metila), poli(acrilato de isopropila), poli(acrilato de isobutila), poli(acrilato de octadecila), e as combinações de



qualquer um destes. Em uma realização, as nanopartículas da invenção incluem polímeros de PEG-PLGA.

As composições da invenção também podem ser aplicadas topicamente. Para a aplicação tópica, as composições são fornecidas em qualquer excipiente farmacêuticamente aceitável que seja aprovado para a aplicação ocular. De preferência, a composição é aplicada na forma de gotas à superfície do olho. Para algumas aplicações, a aplicação da composição é baseada na difusão dos compostos através da córnea ao interior do olho.

Os elementos versados na técnica irão reconhecer que os melhores regimes de tratamento para o uso dos compostos da presente invenção para o tratamento de um PCD ocular podem ser diretamente determinados. Esta não é uma questão de experimentação, mas sim de otimização, a qual é executada rotineiramente nas artes médicas. Os estudos *in vivo* em camundongos pelados freqüentemente fornecem um ponto de início a partir do qual se começa a otimizar os regimes de dosagem e de aplicação. A freqüência das injeções será inicialmente uma vez por semana, tal como foi feito em alguns estudos com camundongos. No entanto, essa freqüência pode ser favoravelmente ajustada de um dia ou quinzenalmente ou até um mês, dependendo dos resultados obtidos a partir das experimentações clínicas iniciais e das necessidades de um paciente particular.

As quantidades de dosagem humana podem ser inicialmente determinadas ao extrapolar a quantidade de composto utilizada nos camundongos, como um elemento versado na técnica reconhece que é rotineira no estado da técnica a modificação da dosagem para os seres humanos comparados aos modelos animais. Em determinadas realizações previstas em que a dosagem pode variar entre aproximadamente 1 mg de composto/kg de peso corpóreo a aproximadamente 5.000 mg/kg de



peso corpóreo; ou de aproximadamente 5 mg/Kg de peso corpóreo a aproximadamente 4.000 mg/Kg de peso corpóreo ou de aproximadamente 10 mg/Kg de peso corpóreo a aproximadamente 3.000 mg/Kg de peso corpóreo; ou de aproximadamente 50 mg/Kg de peso corpóreo a aproximadamente 2.000 mg/Kg de peso corpóreo; ou de aproximadamente 100 mg/Kg de peso corpóreo a aproximadamente 1.000 mg/Kg de peso corpóreo; ou de aproximadamente 150 mg/Kg de peso corpóreo a aproximadamente 500 mg/Kg de peso corpóreo. Em outras realizações, essa dose pode ser de aproximadamente 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1.000, 1.050, 1.100, 1.150, 1.200, 1.250, 1.300, 1.350, 1.400, 1.450, 1.500, 1.600, 1.700, 1.800, 1.900, 2.000, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000, 4.500, 5.000 mg/kg de peso corpóreo. Em outras realizações, está previsto que doses mais elevadas podem ser utilizadas, sendo que tais doses podem ficar compreendidas na faixa de aproximadamente 5 mg de composto/kg de peso a aproximadamente 20 mg de composto/kg de peso. Em outras realizações, as doses podem ser de aproximadamente 8, 10, 12, 14, 16 ou 18 mg/Kg de peso corpóreo. Naturalmente que essa quantidade de dosagem pode ser ajustada para cima ou para baixo, como é feito rotineiramente em tais protocolos de tratamento, dependendo dos resultados das experimentações clínicas iniciais e das necessidades de um paciente particular.

Ensaio de Seleção

Conforme discutido na presente invenção, as proteínas mal-dobradas freqüentemente interferem na função biológica normal das células e causam PCD. Em muitos casos, a acumulação de proteínas mal-dobradas causa danos celulares e citotoxicidade dos agregados de proteína. Os compostos úteis corrigem ou impedem o dobramento incorreto de proteínas ao aumentar a quantidade de uma proteína mutante que esteja em



uma conformação bioquimicamente ativa. Qualquer número de métodos está disponível para realizar ensaios de seleção para identificar tais compostos. Em uma abordagem, uma proteína mutante que não adota uma conformação de proteína do tipo selvagem é expressa em uma célula (por exemplo, uma célula in vitro ou in vivo); a célula entra em contato com um composto candidato; e o efeito do composto na conformação da proteína mutante é testado utilizando qualquer método conhecido no estado da técnica ou descrito na presente invenção. Um composto que aumenta o rendimento da presente proteína corretamente dobrada na célula contatada relativamente a uma célula do controle que não entre em contato com o composto é considerado útil nos métodos da invenção. Um aumento na quantidade de uma proteína corretamente dobrada é testado, por exemplo, ao medir a absorção da proteína em um comprimento de onda característico (por exemplo, 500 nm para a rodopsina), ao medir uma diminuição na agregação intracelular da proteína ao medir uma diminuição na citotoxicidade, ao medir a mitigação de um fenótipo relacionado a PCD ou ao medir um aumento na atividade biológica da proteína utilizando qualquer método padrão (por exemplo, atividade enzimática, associação com um ligando). Em uma abordagem relacionada, a seleção é realizada na presença de 11-cis-retinal, 9-cis-retinal ou um análogo ou um derivado dos mesmos. Os compostos úteis aumentam a quantidade de proteína em uma conformação bioquimicamente funcional em pelo menos 10%, 15% ou 20%, ou de preferência em 25%, 50% ou 75%; ou com a máxima preferência em pelo menos 100%, 200%, 300% ou até mesmo 400%.

Caso desejado, a eficácia do composto identificado é testada em um modelo animal que tem um PCD (por exemplo, um modelo animal de retinite pigmentosa, fibrose cística, mal de Huntington, mal de Parkinson, mal de Alzheimer, diabetes

nefrogênico insípido, câncer (por exemplo, câncer relacionado às mutações de p53) e distúrbios relacionados a príons (por exemplo, mal de Jacob-Creutzfeld).

Compostos de Teste e Extratos

5 Em geral, os compostos com a capacidade de aumentar a quantidade de uma proteína corretamente dobrada em uma célula são identificados a partir de grandes bibliotecas de produtos naturais ou de extratos sintéticos (ou semi-sintéticos) ou a partir de bibliotecas químicas de acordo com
10 os métodos conhecidos no estado da técnica. Os elementos versados no campo da descoberta e do desenvolvimento de drogas irão compreender que a fonte precisa dos extratos ou compostos de teste não é essencial ao(s) procedimento(s) de seleção da invenção. Conseqüentemente, virtualmente qualquer
15 número de extratos ou compostos químicos pode ser selecionado utilizando os métodos descritos na presente invenção. Os exemplos de tais extratos ou compostos incluem, mas sem ficar a eles limitados, extratos à base de plantas, extratos fúngicos, procarióticos à base de animais, caldos de
20 fermentação e sintéticos, bem como a modificação de compostos existentes. Numerosos métodos também estão disponíveis para a geração da síntese aleatória ou dirigida (por exemplo, semi-síntese ou síntese total) de qualquer número de compostos químicos, incluindo, mas sem ficar a eles limitados,
25 compostos à base de sacarídeos, lipídeos, peptídeos e ácido nucléico. As bibliotecas de compostos sintéticos estão comercialmente disponíveis junto a Brandon Associates (Merrimack, N. H.) e Aldrich Chemical (Milwaukee, Wis.). Alternativamente, as bibliotecas de compostos naturais na
30 forma de extratos bacterianos, fúngicos, de plantas e de animais estão comercialmente disponíveis junto a uma série de fontes, incluindo Biotics (Sussex, Reino Unido), Xenova (Slough, Reino Unido), Harbor Branch Oceanographics (Institute



(Ft. Pierce, Fla.) e PharmaMar, EUA (Cambridge, Mass.). Além disso, as bibliotecas produzidas natural ou sinteticamente são produzidas, caso desejado, de acordo com os métodos conhecidos no estado da técnica, por exemplo, por meio dos
5 métodos padrão de extração e de fracionamento. Além disso, caso desejado, qualquer biblioteca ou composto é facilmente modificado utilizando métodos químicos, físicos ou bioquímicos padrão.

Além disso, os elementos versados na técnica de
10 descoberta e desenvolvimento de drogas compreendem facilmente que os métodos para a desreplicação (por exemplo, a desreplicação taxonômica, a desreplicação biológica e a desreplicação química, ou qualquer combinação das mesmas) ou a eliminação das réplicas ou repetições dos materiais já
15 conhecidos por sua atividade de correção de proteínas mal-dobradas devem ser empregados sempre que possível.

Quando se verifica que um extrato bruto corrige a conformação de uma proteína mal-dobrada e um fracionamento adicional do extrato de ligação positivo, é necessário isolar
20 os constituintes químicos responsáveis pelo efeito observado. Desse modo, o objetivo da extração, do fracionamento e do processo de purificação é a caracterização e a identificação cuidadosas de uma entidade química dentro do extrato bruto que aumenta o rendimento de uma proteína corretamente
25 dobrada. Os métodos de fracionamento e de purificação de tais extratos heterógenos são conhecidos no estado da técnica. Caso desejado, os compostos mostrados como sendo agentes úteis para o tratamento de qualquer patologia relacionada a uma proteína mal-dobrada ou à agregação de proteínas são
30 modificados quimicamente de acordo com os métodos conhecidos no estado da técnica.

Terapias de Combinação

As composições da invenção úteis para o tratamento de um PCD (por exemplo, retinite pigmentosa, mal de Huntington, mal de Parkinson, mal de Alzheimer, diabetes nefrogênico insípido, câncer e distúrbios relacionados a prions, tal como o mal de Jacob-Creutzfeld) podem, caso desejado, ser administradas em combinação com qualquer terapia padrão conhecida no estado da técnica. Para a retinite pigmentosa, as terapias padrão incluem suplementos de vitamina A. No caso do mal de Parkinson, as terapias padrão incluem a administração de qualquer um ou mais do seguinte: agonistas do receptor de dopamina levodopa/carbidopa, amantadina, bromocriptina, pergolida, apomorfina, benserazida, lisurida, mesulergina, lisurida, lergotrila, memantina, metergolina, piribedila, tiramina, tirosina, fenilalanina, mesilato de bromocriptina, mesilato de pergolida; outras terapias padrão incluem anti-histamínicos, antidepressivos, agonistas de dopamina, inibidores de oxidase de monoamina. Para o mal de Huntington, as terapias padrão incluem a administração de qualquer um ou mais do seguinte: haloperidol, fenotiazina, reserpina, tetrabenazina, amantadina e co-enzima Q10. Para o mal de Alzheimer, as terapias padrão incluem a administração de qualquer um ou mais do seguinte: donepezil (Aricept), rivastigmina (Exelon), galantamina (Razadyne) e tacrina (Cognex). Para o diabetes nefrogênico insípido, as terapias padrão incluem a administração de qualquer um ou mais do seguinte: clorotiazida/hidroclorotiazida, amilorida e indometacina. Para o câncer, as terapias padrão incluem a administração de qualquer um ou mais do seguinte: acetato de abiraterona, altretamina, anidrovinblastina, auristatina, bexarotena, bicalutamida, BMS184476, 2,3,4,5,6-pentafluoro-N-(3-fluoro-4-metoxifenil)benzeno sulfonamida, bleomicina, N,N-dimetil-L-valil-L-valil-N-metil-L-valil-L-prolil-L-prolina-



t-butilamida, caquectina, cemadotina, clorambucil, ciclofosfamida, 3',4'-dideidro-4'-deóxi-8'-norvincaleucoblastina, docetaxol, doxetaxel, ciclofosfamida, carboplatina, carmustina (BCNU), cisplatina, criptoficina, 5 citarabina, dacarbazina (DTIC), dactinomicina, daunorubicina, dolastatina, doxorubicina (adriamicina), etoposide, 5-fluorouracila, finasterida, flutamida, hidróxi uréia e hidróxi uréia taxanos, ifosfamida, liarozol, lonidamina, lomustina (CCNU), mecloretamina (mostarda de nitrogênio), 10 melfalano, isetionato de mivobulina, rizoxina, sertenef, estreptozocina, mitomicina, metotrexato, nilutamida, onapristona, paclitaxel, prednimustina, procarbazona, RPR109881, fosfato de estramustina, tamoxifeno, tasonermina, taxol, tretinoína, vinblastina, vincristina, sulfato de 15 vindesina e vinflunina.

Kits

A invenção apresenta kits para o tratamento ou a prevenção de um PCD ou de sintomas do mesmo. Em uma realização, o kit inclui um pacote farmacêutico que 20 compreende uma quantidade eficaz de 11-cis-retinal ou 9-cis-retinal e qualquer um ou mais dos seguintes: um inibidor proteassomal (por exemplo, MG132), um inibidor de autofagia (por exemplo, 3-metiladenina), um inibidor lisossomal (por exemplo, cloreto de amônio), um inibidor do transporte de 25 proteínas do RE ao Golgi (por exemplo, brefeldina A), um inibidor do protetor de Hsp90 (por exemplo, Geldanamicina), um ativador da resposta ao choque térmico (por exemplo, Celastrol), um inibidor de glicosidase (por exemplo, castanoespermina) e um inibidor de desacetilase de histona 30 (por exemplo, Scriptaid). De preferência, as composições estão presentes na forma de dosagem unitária. Em algumas realizações, o kit compreende um recipiente estéril que contém uma composição terapêutica ou profilática; tais



recipientes podem ser caixas, ampolas, garrafas, frascos, tubos, saquinhos, bolsas, embalagens de bolhas ou outras formas apropriadas de recipientes conhecidas no estado da técnica. Tais recipientes podem ser feitos de plástico, vidro, papel laminado, folha de metal ou de outros materiais apropriados para conter medicamentos.

Caso desejado, as composições da invenção ou as combinações das mesmas são fornecidas juntamente com as instruções para a administração a um indivíduo que tem ou está em risco de desenvolver um PCD. As instruções deverão incluir geralmente as informações sobre o uso dos compostos para o tratamento ou a prevenção de um PCD. Em outras realizações, as instruções incluem pelo menos um dos seguintes: a descrição do composto ou da combinação de compostos; a programação e a administração de dosagem para o tratamento de um PCD ou de sintomas do mesmo; precauções; avisos; indicações; contra-indicações; informações sobre superdosagem; reações adversas; a farmacologia animal; estudos clínicos; e/ou referências. As instruções podem ser impressas diretamente no recipiente (quando presente) ou como uma etiqueta aplicada ao recipiente ou como uma folhinha, um panfleto, um cartão ou um folheto separado fornecido em ou com o recipiente.

Os seguintes exemplos são fornecidos para ilustrar a invenção, não para limitar a mesma. Os elementos versados na técnica irão compreender que as construções específicas fornecidas abaixo podem ser alteradas de várias maneiras, consistentemente com a invenção acima descrita enquanto retém as propriedades essenciais dos compostos ou das combinações dos mesmos.

Expressão do Polipeptídeo Recombinante

Uma vez que as composições da invenção aumentam a recuperação dos polipeptídeos recombinantes que têm uma

conformação bioquimicamente ativa, elas são geralmente úteis para intensificar a expressão de virtualmente qualquer polipeptídeo recombinante conhecido no estado da técnica. Em particular, as composições da invenção são úteis para

5 intensificar a recuperação dos polipeptídeos biologicamente ativos que tendem a formar agregados de proteínas inativas ou que formam corpos de inclusão. Para intensificar a recuperação das formas biologicamente ativas de tais proteínas, pelo menos uma ou mais das composições da invenção

10 são adicionadas ao meio de uma célula recombinante (por exemplo, uma célula eucariótica, uma célula de mamífero ou uma célula de levedura) que expressa a proteína nesse momento em que a síntese da proteína é induzida. Tais composições incluem um inibidor proteassomal, um inibidor de autofagia,

15 um inibidor lisossomal, um inibidor do transporte de proteínas do RE ao Golgi, um inibidor do protetor de Hsp90, um inibidor de glicosidase, um ativador da resposta ao choque térmico ou um inibidor de desacetilase de histona. Para aumentar a expressão de uma opsina recombinante ou mutante,

20 11-cis-retinal ou 9-cis-retinal podem ser adicionados ao meio quando da indução.

Em geral, os polipeptídeos recombinantes são produzidos pela transformação de uma célula hospedeira apropriada com toda ou uma parte de uma molécula de ácido

25 nucléico que codifica um polipeptídeo ou fragmento da mesma em um veículo de expressão apropriado. Os elementos versados no campo da biologia molecular irão compreender que qualquer um de uma ampla variedade de sistemas de expressão pode ser utilizado para formar a proteína recombinante. A célula

30 hospedeira precisa utilizada não é essencial à invenção. Um polipeptídeo recombinante pode ser produzido em virtualmente qualquer hospedeiro eucariótico (por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, células de inseto, por exemplo, células Sf21, ou

em células de mamífero, por exemplo, célula NIH 3T3, heLa ou de preferência COS). Tais células estão disponíveis junto a uma ampla faixa de fontes (por exemplo, American Type Culture Collection, Rockland, Md.; vide também, por exemplo, Ausubel et al., Current Protocol in Molecular Biology, New York: John Wiley and Sons, 1997). O método de transfecção e a escolha do veículo de expressão irão depender do sistema hospedeiro selecionado. Os métodos de transformação são descritos, por exemplo, em Ausubel et al. (supra); os veículos de expressão podem ser escolhidos a partir daqueles fornecidos, por exemplo, em Cloning Vectors: A Laboratory Manual (P. H. Pouwels et al., 1985, Supl. 1987).

Uma variedade de sistemas de expressão existe para a produção de polipeptídeos recombinantes. Os vetores de expressão úteis para produzir tais polipeptídeos incluem, sem limitação, vetores cromossomais, episomais e derivados de vírus, por exemplo, vetores derivados de plasmídeos bacterianos, de bacteriófagos, de transposons, episomos de levedura, de elementos de inserção, de elementos cromossomais de levedura, de vírus tais como baculovírus, papova vírus, tais como SV40, vírus de varíola bovina, adenovírus, vírus fowl pox, vírus e retrovírus de pseudo-hidrofobia, e os vetores derivados de combinações dos mesmos.

Uma vez que o polipeptídeo recombinante é expresso, é isolado, por exemplo, utilizando cromatografia de afinidade. Em um exemplo, um anticorpo (por exemplo, produzido tal como descrito na presente invenção) criado contra um polipeptídeo pode ser unido a uma coluna e ser utilizado para isolar o polipeptídeo recombinante. A lise e o fracionamento de células que abrigam polipeptídeos antes da cromatografia de afinidade podem ser executados por métodos padrão (vide, por exemplo, Ausubel et al., supra). Uma vez isolada, a proteína recombinante pode, caso desejado, ser

adicionalmente purificada, por exemplo, por meio de cromatografia líquida de alto desempenho (vide, por exemplo, Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry and Molecular Biology, eds., Work and Burdon, Elsevier, 1980).

5 EXEMPLOS

A retinite pigmentosa (RP) compreende um grupo heterogêneo de distúrbios retinais herdados que conduzem à morte do fotorreceptor de haste. A morte dos fotorreceptores resulta na cegueira noturna e na visão em túnel subsequente
10 devido à perda progressiva da visão periférica nos pacientes que sofrem de retinite pigmentosa. Entre 20-25% dos pacientes com Retinite Pigmentosa Autossomal Dominante (RPAD) têm uma mutação no gene da rodopsina, sendo que a mutação mais comum é o P23H. A mutação de P23H resulta em uma proteína de
15 opsina mal-dobrada que não se associa com 11-cis-retinal. A proteína mal-dobrada de P23H é retida dentro das células, onde forma agregados (Saliba et. al. 2002. JCS 115:2907-2918; Illing et. al. 2002. JBC 277: 34150-34160). Esse comportamento de agregação classifica algumas mutações da RP,
20 incluindo o P23H, como os distúrbios de conformação de proteínas (PCD).

Embora os seguintes exemplos se refiram ao uso da proteína mutante de P23H para a identificação dos compostos que reduzem a agregação da proteína mal-dobrada e aumentam o
25 rendimento da proteína corretamente dobrada, a invenção não é desse modo limitada. Os compostos identificados como sendo úteis para aumentar o rendimento de P23H corretamente dobrado em uma célula são não somente úteis para o tratamento da retinite pigmentosa. Tais compostos estão propensos a
30 aumentar o rendimento de qualquer proteína mal-dobrada e são geralmente úteis para o tratamento de virtualmente qualquer distúrbio de conformação de proteínas.

O resgate de proteínas mal-dobradas e agregadas tem sido cada vez mais demonstrado com a utilização de protetores farmacológicos específicos. Os inibidores de enzima competitivos também têm sido utilizados como protetores farmacológicos, chamados algumas vezes de protetores químicos específicos em doenças que incluem Fabry, GM1-gangliosidose, Gaucher, Tay-sachs e RP 17. Para determinar se a inibição dos processos utilizados geralmente pelas células para o dobramento, o transporte e a degradação de proteínas poderia aumentar o rendimento de proteínas corretamente dobradas em uma célula, os compostos exemplificadores das seguintes classes foram testados: inibidores proteassomais, inibidores de autofagia, inibidores lisossomais, inibidores do transporte de proteínas do RE ao Golgi, inibidores de protetor de Hsp90, ativadores da resposta ao choque térmico, inibidores de glicosidase e inibidores de desacetilase de histona.

Os estudos precedentes mostraram que o cromóforo nativo de 11-cis-retinal promove quantitativamente o dobramento *in vivo* e a estabilização da opsina de P23H, como 9-cis-retinal e um isômero travado de sete anéis de 11-cis-retinal (Noorwez et. al. J. Biol Chem, 18 de abril de 2003; 278(16): 14442-50). Como a proteína de tipo selvagem, a proteína mutante de P23H resgatada formou pigmento, adquiriu a glicosilação madura e foi transportada à superfície da célula. No presente estudo, o efeito dos inibidores de várias enzimas celulares e os caminhos que podem participar do destino intracelular da opsina de P23H são analisados.

Exemplo 1: Uma linhagem de células que expressa a opsina de P23H foi utilizada para testar o dobramento da proteína.

As opsinas mutantes de P23H e do tipo selvagem foram expressas separadamente em linhagens de células HEK293 estáveis indutíveis por tetraciclina na presença de 11-cis-

retinal e de vários inibidores. Em vinte e oito horas, as proteínas dobradas foram purificadas por imunoafinidade e foram quantificadas pela espectroscopia visível de UV. A quantidade total de proteína de opsina foi testada a 280 nm.

5 A quantidade de rodopsina presente em uma conformação bioquimicamente funcional foi testada a 500 nm. A microscopia de imunofluorescência também foi executada para determinar a posição celular das proteínas.

Exemplo 2: A inibição proteassomal aumentou a recuperação de P23H corretamente dobrado.

MG132, um inibidor reversível do proteassomo, foi adicionado ao meio de cultura da linhagem de células HEK293 descrita no Exemplo 1 no momento da indução. A inibição proteassomal resultou na recuperação de mais de 200-250% de rodopsina tal como mostrado na Figura 1A. Por outro lado, o rendimento da rodopsina do tipo selvagem aumentou em somente 35-40% (Figura 1B).

Exemplo 3: A inibição da autofagia aumentou a recuperação de P23H corretamente dobrado.

20 A autofagia foi bloqueada nas células HEK293 do Exemplo 1 ao adicionar 3-metiladenina ao meio de cultura no momento da indução. Isto conduz a um aumento de 350-400% na recuperação da rodopsina de P23H sendo que somente 50-60% mais da rodopsina do tipo selvagem foram recuperados (Figuras 2A e 2B).

Exemplo 4: A inibição lisossomal aumentou a recuperação de P23H corretamente dobrado.

O cloreto de amônio, um inibidor lisossomal, foi adicionado ao meio de cultura das células HEK293 do Exemplo 1 no momento em que a síntese da proteína de P23H foi induzida. De um modo interessante, a inibição lisossomal conduziu a um aumento de 30% na recuperação da rodopsina de P23H e em um

aumento de 10% na recuperação da rodopsina do tipo selvagem (Figuras 3A e 3B).

Exemplo 5: O bloqueio do transporte do RE ao Golgi aumentou o rendimento de P23H corretamente dobrado.

5 O transporte anterógrado das proteínas do ER ao Golgi foi bloqueado nas células HEK293 do Exemplo 1 ao adicionar a brefeldina A no momento da indução. Esse tratamento resultou em um aumento de duas vezes no rendimento da rodopsina de P23H (Figura 4A). O aumento correspondente no
10 rendimento para a rodopsina do tipo selvagem foi de aproximadamente 60% (Figura 4B).

Exemplo 6: A inibição de Hsp90 aumentou a recuperação de P23H corretamente dobrado.

Um inibidor específico do protetor de Hsp90, Geldanamicina, foi adicionado ao meio de cultura de células HEK293 descritas no Exemplo 1 no momento da indução. A administração de Geldanamicina às células que expressam as opsinas do tipo selvagem e as opsinas de P23H conduz a um aumento de 60% na recuperação da rodopsina de P23H (Figura
20 5A). Houve somente um aumento insignificante na recuperação da rodopsina do tipo selvagem (Figura 5B).

Exemplo 7: A ativação da resposta ao choque térmico aumenta o rendimento de P23H corretamente dobrado.

A resposta ao choque térmico foi ativada nas
25 células HEK293 do Exemplo 1 ao adicionar Celastrol no momento da indução. Esse tratamento resultou em um aumento de 40% na rodopsina de P23H (Figura 6A). O celastrol teve um efeito muito menor na recuperação da rodopsina do tipo selvagem (~5-7%) (Figura 6B).

30 **Exemplo 8: O diidro-celastrol aumentou a recuperação das rodopsinas do tipo selvagem e das rodopsinas de P23H.**

O efeito de um diidro-celastrol, um derivado de celastrol, na recuperação da rodopsina de P23H foi testado

nas células HEK293 do Exemplo 1. O diidro-celastrol aumentou a recuperação das rodopsinas do tipo selvagem e das rodopsinas de P23H em aproximadamente 5-10% (Figuras 7A e 7B).

- 5 **Exemplo 9: A inibição da desacetilase de histona aumentou a recuperação das rodopsinas do tipo selvagem e das rodopsinas de P23H.**

Um inibidor de desacetilase de histona, Scriptaid, foi adicionado ao meio de cultura das células HEK293
10 descritas no Exemplo 1 no momento da indução. O Scriptaid aumentou a recuperação das rodopsinas do tipo selvagem e das rodopsinas de P23H em aproximadamente 30% (Figuras 8A e 8B).

Exemplo 10: 11-cis-retinal intensificou o resgate de opsinas na presença de inibidores.

15 Conforme mostrado na Tabela 1, cada um dos seguintes inibidores aumentou a recuperação das rodopsinas dobradas na presença de 11-cis-retinal: glicosidase 1 & 2 (Castanoespermina), o transporte anterógrado do RE ao Golgi (Brefeldina A), Hsp90 (Geldanamicina), o proteassomo (MG132),
20 autofagia (3-MA) e os lisossomos (cloreto de amônio). MG132 e 3-metiladenina mostraram o efeito mais drástico na recuperação das rodopsinas dobradas.

Tabela 1: Efeito dos Inibidores na Recuperação da Rodopsina

Compostos	P23H (% de aumento na recuperação)	PESO (% de aumento da recuperação)
MG132	230	140
3MA	400	159
Cloreto de amônio	138	115
Brefeldina A	210	160
Geldanamicina	170	115
Celastrol	150	115
Acetato de diidro celastrol	123	105
Scriptaid	131	130

25 Para determinar se o efeito dos inibidores requer a presença do protetor específico de 11-cis-retinal, cada um dos inibidores foi testado sozinho. MG132, que é um inibidor

proteassomal, aumentou a recuperação da rodopsina corretamente dobrada de P23H em 150% na ausência de 11-cis-retinal. 3-metiladenina, que é um inibidor autofágico, aumentou a recuperação da rodopsina corretamente dobrada de P23H em 200% na ausência de 11-cis-retinal. Rendimentos reduzidos de opsinas corretamente dobradas de P23H foram recuperados quando as células cresceram na presença de outros inibidores sem a adição de 11-cis-retinal.

A mutação de P23H desestabiliza a opsina e causa a sua agregação dentro da célula. P23H incorretamente dobrado é incapaz de ligar seu ligando natural, 11-cis-retinal. A adição de 11-cis-retinal ao meio de cultura de células que expressam o mutante de P23H torna o ligando acessível aos intermediários de opsina de dobramento anterior e um aumento de 5-6 vezes no rendimento da rodopsina é conseguido. Esse efeito é específico para o mutante e nenhum efeito é visto quando 11-cis-retinal é adicionado aos meios de células que expressam a opsina do tipo selvagem. A combinação de 11-cis-retinal e de cada um entre um inibidor proteassomal, um inibidor de autofagia, um inibidor lisossomal, um inibidor do transporte de proteínas do RE ao Golgi, um inibidor do protetor de Hsp90, um ativador da resposta ao choque térmico ou um inibidor de desacetilase de histona aumentou a recuperação de P23H em uma conformação bioquimicamente funcional.

Uma proteína de P23H que tem uma conformação bioquimicamente funcional exibe a atividade biológica da proteína do tipo selvagem em um ensaio funcional. Por exemplo, uma proteína de P23H, quando expressa tal como descrito na presente invenção, pode ser ativada pela luz e se converte em metarodopsina II. Essa conversão é monitorada espectrofotometricamente. Além disso, uma proteína de P23H, quando expressa tal como descrito na presente invenção, pode

ser isolada como parte de uma membrana celular. Quando a transducina é adicionada à membrana isolada que contém P23H, a proteína de P23H pode ativar a transducina da proteína G heterotrimérica e provocar a troca de GDP por GTP por uma subunidade de transducina. Em um modelo animal de retinite pigmentosa, espera-se que a administração das composições da invenção (por exemplo, 11-cis-retinal em combinação com qualquer um ou mais de um inibidor proteassomal, um inibidor de autofagia, um inibidor lisossomal, um inibidor do transporte de proteínas do RE ao Golgi, um inibidor do protetor de Hsp90, um ativador da resposta ao choque térmico, um inibidor de glicosidase ou um inibidor de desacetilase de histona) recupere ou elimine funcionalmente os sintomas associados com o fenótipo da retinite pigmentosa.

15 **Material e Métodos**

Linhagens de Células e Condições de Cultura

As linhagens de células HEK293 que expressam a opsina de P23H do tipo selvagem estável foram geradas no sistema Flp-In T-Rex (Invitrogen). As células HEK293 cresceram em meios com glicose elevada em DMEM suplementados com 10% de soro bovino fetal, solução antibiótica-antimicótica, 5 µg/ml de blasticidina e higromicina a 37°C na presença de CO₂ a 8%.

Indução da Produção de Opsina e Adição de Inibidores

As linhagens de células HEK293 que expressam a opsina foram colocadas para atingir a afluência e foram induzidas com 1 µg/ml de tetraciclina após uma mudança de meio. 10 µM de 11-cis-retinal foram adicionados imediatamente após a indução sob uma luz vermelha e os inibidores foram adicionados simultaneamente nas concentrações mostradas na Tabela 2 (abaixo).

Tabela 2

Inibidores utilizados	Concentrações utilizadas
-----------------------	--------------------------

MG132	250 nM
3-metiladenina	10 mM
Cloreto de amônio	30 mM
Brefeldina A	100 ng/ml
Geldanamicina	750 nM
Celastrol	1 μ M
Diidro-celastrol	1 μ M
Scriptaid	4 μ M
Cifunensina	20 μ M

As placas foram incubadas por vinte e oito horas. 10 μ M de retinal foram aplicados vinte e quatro horas após a primeira aplicação, sob luz vermelha.

Colheita de Células e Purificação de Rodopsina.

5 Vinte e oito horas após a indução e administração do inibidor, as células HEK293 foram colhidas e a rodopsina foi essencialmente purificada tal como descrito em Noorwez et. al. (J. Biol Chem, 16 de abril de 2004; 279(16): 16278-84). As varreduras espectrofotométricas foram feitas em um
10 espectrofotômetro Varian Cary 50.

Outras Realizações

A partir da descrição acima, ficará evidente que variações e modificações podem ser feitas na invenção descrita na presente invenção para serem adotadas em vários
15 usos e condições. Tais realizações também estão dentro do âmbito das reivindicações seguintes.

A recitação de uma lista de elementos em qualquer definição de uma variável na presente invenção inclui definições dessa variável como qualquer elemento ou
20 combinação única (ou sub-combinação) dos elementos correlacionados. A recitação de uma realização na presente invenção inclui essa realização como qualquer realização única ou em combinação com quaisquer outras realizações ou partes da mesma.

25 Todas as patentes e publicações mencionadas neste relatório descritivo são incorporadas na presente invenção a título de referência até a mesma extensão como se cada



patente e publicação independente fosse indicada especificamente e individualmente para ser incorporada a título de referência.

REIVINDICAÇÕES

1. USO DE UM COMPOSTO SELECIONADO DO GRUPO QUE CONSISTE EM UM INIBIDOR PROTEASSOMAL, UM INIBIDOR DE AUTOFAGIA, UM INIBIDOR LISSOMAL, UM INIBIDOR DO TRANSPORTE
5 DE PROTEÍNA DO ER AO GOLGI, UM INIBIDOR DE CHAPERONINA HSP90, UM ATIVADOR DA RESPOSTA A CHOQUE TÉRMICO, UM INIBIDOR DE GLICOSIDASE, E UM INIBIDOR DE HISTONA DEACETILASE, caracterizado por ser na fabricação de um medicamento para tratar um indivíduo que tem um distúrbio de conformação de
10 proteína (PCD), tratamento este que consiste em administrar uma quantidade suficiente do composto para tratar o indivíduo.

2. USO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o PCD é um PCD ocular
15 selecionado do grupo que consiste em retinite pigmentosa, degeneração macular relacionada com a idade, glaucoma, distrofias corneais, retinosquise, mal de Stargardt, gânglios dominantes autossomais, e distrofia macular de Best.

3. USO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente 11-
20 cis-retinal, 9-cis-retinal, ou um isômero travado de sete anéis de 11-cis-retinal.

4. USO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o PCD ocular é retinite
25 pigmentosa ou degeneração macular relacionada com a idade.

5. USO DE 11-CIS-RETINAL OU 9-CIS-RETINAL E UM COMPOSTO SELECIONADO DO GRUPO QUE CONSISTE EM UM INIBIDOR PROTEASSOMAL, UM INIBIDOR DE AUTOFAGIA, UM INIBIDOR LISSOMAL, UM INIBIDOR DO TRANSPORTE DE PROTEÍNA DO ER AO
30 GOLGI, UM INIBIDOR DE CHAPERONINA HSP90, UM ATIVADOR DE RESPOSTA A CHOQUE TÉRMICO, UM INIBIDOR DE GLICOSIDASE, E UM INIBIDOR DE HISTONA DEACETILASE, caracterizado por ser na fabricação de um medicamento para tratar um indivíduo

diagnosticado como tendo retinite pigmentosa, tratamento este que consiste em administrar simultaneamente 11-cis-retinal ou 9-cis-retinal e o composto ou dentro de quatorze dias de intervalo entre si em quantidades suficientes tratar o

5 indivíduo.

6. USO, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que 11-cis-retinal é um isômero travado de sete anéis de 11-cis-retinal.

7. USO, de acordo com a reivindicação 1 ou 5, caracterizado pelo fato de que o indivíduo compreende uma mutação que afeta a multiplicação de proteína.

10

8. USO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a mutação é em uma opsina.

9. USO, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a opsina compreende uma mutação de P23H.

15

10. USO, de acordo com a reivindicação 1 ou 5, caracterizado pelo fato de que o inibidor proteassomal é selecionado do grupo que consiste em MG132, lactocistina, clasto-lactocistin-beta-lactona, PSI, MG-115, MG-101, N-Acetil-Leu-Leu-Met-CHO, N-carbobenzoil-Gli-Pro-Fe-Leu-CHO, N-carbobenzoil-Gli-Pro-Ala-Fe-CHO, N-carbobenzoil-Leu-Leu-Fe-CHO, e sais ou análogos destes.

20

11. USO, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o inibidor proteassomal é um inibidor reversível de proteassoma.

25

12. USO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o inibidor proteassomal reversível é MG132.

13. USO, de acordo com a reivindicação 1 ou 5, caracterizado pelo fato de que o inibidor de autofagia é selecionado do grupo que consiste em 3-metil adenina, 3-metil adenosina, adenosina, ácido ocadaico, N⁶-mercaptopurina

30

riboside (N^6 -MPR), 5-amino-4-imidazol carboxamida riboside (AICAR), bafilomicina A1, e os sais ou análogos destes.

14. USO, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o inibidor de autofagia é a 3-
5 metil adenina.

15. USO, de acordo com a reivindicação 1 ou 5, caracterizado pelo fato de que o inibidor lisossomal é selecionado do grupo que consiste em leupeptina, trans-epoxisaccinil-L-leucilamida-(4-guanidino)butano, éster
10 metílico de L-metionina, cloreto de amônio, metilamina, cloroquina, e os sais ou análogos destes.

16. USO, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o inibidor lisossomal é o cloreto de amônio.

15 17. USO, de acordo com a reivindicação 1 ou 5, caracterizado pelo fato de que o inibidor do transporte da proteína do ER ao Golgi é brefeldin A e os sais ou análogos destes.

18. USO, de acordo com a reivindicação 1 ou 5, caracterizado pelo fato de que o inibidor de chaperonina Hsp90 é selecionado do grupo que consiste em antibióticos de benzoquinona ansamicina, Geldanamicina, 17-alilamino17-demetoxigeldanamicina, radicicol, novobiocina, e um inibidor de Hsp90 que se liga ao bolso de Hsp90 ATP/ADP, e os sais ou
25 análogos destes.

19. USO, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o inibidor do patrocinador d Hsp90 é a Geldanamicina.

20. USO, de acordo com a reivindicação 1 ou 5, caracterizado pelo fato de que um ativador de resposta a choque térmico é selecionado do grupo que consiste em Celastrol, éster metílico de celastrol, diacetato de
30

diidrocelastrol, éster butílico de celastrol, e diidrocelastrol.

21. USO, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o ativador de resposta a 5 choque térmico é o Celastrol.

22. USO, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o ativador de resposta de choque térmico é o diidrocelastrol.

23. USO, de acordo com a reivindicação 1 ou 5, o 10 inibidor de glicosidase é selecionado do grupo que consiste em cloridreto de australina, castanospermina, 6-Acetamido-6-deoxi-castanospermina, cloridreto de deoxifaconojirimicina (DFJ), deoxinojirimicina (DNJ), cloridreto de deoxigalactonojirimicina (DGJ), cloridreto de 15 deoximannojirimicina (DMJ), cloridreto de 2R,5R-Bis(hidroximetil)-3R, 4R-diidroxi-pirrolidina (DMDP), cloridreto de 1,4-Dideoxi-1,4-imino-D-manitol, cloridreto de 3R,4R,5R,6R-3,4,5,6-Tetraidroxiazepano, 1,5-Dideoxi-1,5-imino-xilitol, Kifunensine, N-butildeoxinojirimicina (BDNJ), 20 N-nonil DNJ (NDNJ), N-hexil DNJ (HDNJ), N-metildeoxinojirimicina (MDNJ), e os sais ou análogos destes.

24. USO, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o inibidor de glicosidase é a castanospermina.

25 25. USO, de acordo com a reivindicação 1 ou 5, o inibidor de histona deacetilase é selecionado do grupo que consiste em Scriptaid, APHA composto 8, Apicidina, butirato de sódio, (-)-Depudecina, Sirtinol, tricostatina A, e os sais ou análogos destes.

30 26. USO, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o inibidor de histona deacetilase é Scriptaid.

27. USO, de acordo com a reivindicação 3 ou 5, caracterizado pelo fato de que o dito tratamento consiste em administrar 11-cis-retinal ou 9-cis-retinal e o composto dentro de um intervalo de dez dias entre si.

5 28. USO, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o dito tratamento consiste em administrar 11-cis-retinal ou 9-cis-retinal e o composto dentro de um intervalo de cinco dias entre si.

10 29. USO, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o dito tratamento consiste em administrar 11-cis-retinal ou 9-cis-retinal e o composto dentro de um intervalo de vinte e quatro horas entre si.

15 30. USO, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o dito tratamento consiste em administrar 11-cis-retinal ou 9-cis-retinal e o composto simultaneamente.

20 31. USO, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o dito tratamento consiste em administrar 11-cis-retinal ou 9-cis-retinal e o composto ao olho.

32. USO, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que a administração é intra-ocular.

25 33. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 30-32, caracterizado pelo fato de que cada um dentre 11-cis-retinal ou 9-cis-retinal e o composto é incorporado em uma composição que propicia a sua liberação a longo prazo.

30 34. USO, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a composição é uma microesfera, uma nanoesfera, ou uma nanoemulsão.

35. USO, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que a liberação a longo prazo é através de um dispositivo de aplicação da droga.

5 36. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5-36, caracterizado pelo fato de que o dito tratamento compreende adicionalmente a administração de um suplemento de vitamina A.

10 37. USO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o PCD é selecionado do grupo que consiste na deficiência de α_1 -antitripsina, fibrose cística, mal de Huntington, mal de Parkinson, mal de Alzheimer, diabetes insipidus nefrogênico, câncer, e mal de Jacob-Creutzfeld.

15 38. USO, de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que o PCD é a fibrose cística e que compreende adicionalmente a administração de um agente selecionado do grupo que consiste em antibióticos, suplementos de vitaminas A, D, E e K, bronchodilatação de albuterol, dornase, e ibuprofen.

20 39. USO, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que o PCD é o mal de Huntington e que compreende adicionalmente a administração de um agente selecionado do grupo que consiste em haloperidol, fenotiazina, reserpina, tetrabenazina, amantadina, e co-
25 enzima Q10.

40. USO, de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que o PCD é o mal de Parkinson e que compreende adicionalmente a administração de um agente selecionado do grupo que consiste em levodopa, amantadina,
30 bromocriptina, pergolide, apomorfina, benserazide, lisuride, mesulergine, lisuride, lergotrile, memantine, metergoline, piribedil, tiramina, tirosina, fenilalanina, mesilato de

bromocriptina, mesilato e pergolide, anti-histamines, antidepressivos, e inibidores de monoamina oxidase.

41. USO, de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que o PCD é o mal de Alzheimer, e
5 que compreende adicionalmente a administração de um agente selecionado do grupo que consiste em donepezil, rivastigmina, galantamina, e tacrina.

42. USO, de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que o PCD é o diabetes insipidus
10 nefrogênico e que compreende adicionalmente a administração de um agente selecionado do grupo que consiste em clorotiazida/hidroclorotiazida, amiloride, e indometacina.

43. USO, de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que o PCD é o câncer, e que
15 compreende adicionalmente a administração de um agente selecionado do grupo que consiste em acetato de abiraterone, altretamina, anidrovinblastine, auristatin, bexarotene, bicalutamide, BMS184476, 2,3,4,5,6-pentafluoro-N-(3-fluoro-4-metoxifenil)benzeno sulfonamida, bleomicina, N,N-dimetil-L-valil-N-metil-L-valil-L-prolil-1-Lprolina-t-butilamida,
20 caquectina, cemadotin, clorambucil, ciclofosfamida, 3',4'-dideidro-4'-deoxi-8'-norvin- caleucoblastina, docetaxol, doxetaxel, ciclofosfamida, carboplatina, carmustine (BCNU), cisplatina, criptoficina, citarabine, dacarbazine (DTIC),
25 dactinomicina, daunorubicina, dolastatina, doxorubicina (adriamicina), etoposide, 5-fluorouracil, finasteride, flutamide, hidroxiuréia e hidroxiuréiataxanes, ifosfamida, liarozole, lonidamine, lomustine (CCNU), mecloretamine (mostarda de nitrogênio), melfalan, isetionato de mivobulin,
30 rizoxin, sertenef, estreptozocina, mitomicina, metotrexate, nilutamida, onapristone, paclitaxel, prednimustine, procarbazine, RPR109881, fosfato de estramustine, tamoxifen,

tasonermina, taxol, tretinoína, vinblastine, vincristine, sulfato de vindesine, e vinflunina.

44. MÉTODO PARA AUMENTAR A QUANTIDADE DE UM CONFORMAÇÃO BIOQUIMICAMENTE FUNCIONAL DE UMA PROTEÍNA EM UMA
5 CÉLULA, sendo que o método é caracterizado pelo fato de compreender:

a) a colocação de uma célula em contato com uma quantidade eficaz de pelo menos um composto selecionado do grupo que consiste em: um inibidor proteassomal, um inibidor
10 de autofagia, um inibidor lisossomal, um inibidor do transporte da proteína do ER ao Golgi, um inibidor de chaperonina Hsp90, um ativador da resposta a choque térmico, um inibidor de glicosidase, e um inibidor de histona deacetilase; e

15 b) a identificação de um aumento na quantidade de uma conformação bioquimicamente funcional da proteína.

45. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 44, caracterizado pelo fato de que o método compreende adicionalmente a colocação da célula em contato com 11-cis-
20 retinal, 9-cis-retinal, ou um isômero travado de sete anéis de 11-cis-retinal.

46. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que a célula compreende uma proteína mutante que forma a um agregado ou uma fibrila.

25 47. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que a célula compreende uma proteína de opsina mutante.

48. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que a célula compreende uma
30 proteína de miocilina mutante.

49. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que a célula compreende uma proteína de lipofuscina mutante.

50. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que a célula compreende uma proteína de β -H3 mutante.

51. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44-50, caracterizado pelo fato de que a célula é *in vitro*.

52. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44-50, caracterizado pelo fato de que a célula é *in vivo*.

53. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44-52, caracterizado pelo fato de que a célula é uma célula de mamífero.

54. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que a célula é uma célula humana.

55. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE UM PCD OCULAR, caracterizada pelo fato de compreender uma quantidade eficaz de 11-cis-retinal ou 9-cis-retinal e uma quantidade eficaz de pelo menos um composto adicional selecionado do grupo que consiste em um inibidor proteasomal, um inibidor de autofagia, um inibidor lisossomal, um inibidor do transporte de proteína do ER ao Golgi, um inibidor de chaperonina Hsp90, um ativador de resposta a choque térmico, um inibidor de glicosidase e um inibidor de histona deacetilase em um excipiente farmacêuticamente aceitável.

56. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE RETINITE PIGMENTOSA, caracterizada pelo fato de compreender uma quantidade eficaz de 11-cis-retinal ou 9-cis-retinal e uma quantidade eficaz de pelo menos um composto adicional selecionado do grupo que consiste em um inibidor proteassomal, um inibidor de autofagia, um inibidor lisossomal, um inibidor do transporte de proteína do ER ao Golgi, um inibidor de chaperonina Hsp90, um ativador da resposta a choque térmico,

um inibidor de glicosidase e um inibidor de histona deacetilase em um excipiente farmacologicamente aceitável.

57. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 55 ou 56, caracterizada pelo fato de que o inibidor proteossomal é selecionado do grupo que consiste em MG132, lactocistina, clasto-lactocistin-beta-clasto-lactocistin-beta-lactona, PSI, MG-115, MG-101, N-Acetil-Leu-Leu-Met-CHO, N-carbobenzoil-Gli-Pro-Fe-Leu-CHO, N-carbobenzoil-Gli-Pro-Ala-Fe-CHO, N-carbobenzoil-Leu-Leu-Fe-CHO, e os sais ou análogos destes.

58. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 57, caracterizada pelo fato de que o inibidor proteossomal é um inibidor reversível de proteasoma.

59. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 55 ou 56, caracterizada pelo fato de que o inibidor proteossomal reversível é MG132.

60. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 55 ou 56, caracterizada pelo fato de que o inibidor de autofagia é selecionado do grupo que consiste em 3-metil adenina, 3-metil adenosina, adenosina, ácido ocadaico, N⁶-mercaptopurina riboside (N⁶-MPR), 5-amino-4-imidazol carboxamida riboside (AICAR), bafilomicin A1, e os sais ou análogos destes.

61. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 60, caracterizada pelo fato de que o inibidor de autofagia é a 3-metil adenina.

62. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 55 ou 56, caracterizada pelo fato de que o inibidor lisossomal é selecionado do grupo que consiste em leupeptina, transp-epoxisaccinil-L-leucilamida-(4-guanidino)butano, éster metílico de L-metionina, cloreto de amônio, metilamina, cloroquina, e os sais ou análogos destes.

63. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 62, caracterizada pelo fato de que o inibidor lisossomal é o cloreto de amônio.

64. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 55 ou 56, caracterizado pelo fato de que o inibidor do transporte de proteína do ER ao Golgi é brefeldin A e os sais ou análogos deste.

5 65. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 55 ou 56, caracterizada pelo fato de que o inibidor de chaperonina Hsp90 é selecionado do grupo que consiste em antibióticos consistindo de benzoquinona ansamicina, Geldanamicina, 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina,
10 radicicol, novobiocina, e um inibidor de Hsp90 que se liga ao bolso de Hsp90 ATP/ADP, e os sais ou análogos destes.

66. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 65, caracterizada pelo fato de que o inibidor de chaperonina Hsp90 é a Geldanamicina.

15 67. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 55 ou 56, caracterizada pelo fato de que um ativador da resposta a choque térmico é selecionado do grupo que consiste em Celastrol, éster metílico de celastrol, diacetato de diidrocelastrol, éster butílico de celastrol, e
20 diidrocelastrol.

68. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 67, caracterizada pelo fato de que o ativador da resposta a choque térmico é o Celastrol.

25 69. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 67, caracterizada pelo fato de que o ativador da resposta a choque térmico é o diidrocelastrol.

70. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 55 ou 56, caracterizada pelo fato de que o inibidor de glicosidase é selecionado do grupo que consiste em cloridreto
30 de australina, castanospermine, 6-Acetamido-6-deoxi-castanospermine, cloridreto de deoxifuconojirimicina (DFJ), deoxinojirimicina (DNJ), cloridreto de deoxigalactonojirimicina (DGJ), cloridreto de

deoximannojirimicina (DMJ), cloridreto de 2R,5R-Bis(hidroxi metil)-3R,4R-diidroxi pirrolidina (DMDP), cloridreto de 1,4-Dideoxi-1,4-imino-D-manitol, cloridreto de 3R,4R,5R,6R-3,4,5,6-Tetraidroxi azepane, 1,5-Dideoxi-1,5-imino-xilitol, Kifunensine, N-butildeoxinojirimicina (BDNJ),
5 N-nonil DNJ (NDNJ), N-hexil DNJ (HDNJ), N-metildeoxinojirimicina (MDNJ), e os sais ou análogos destes.

71. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 70, caracterizada pelo fato de que o inibidor de glicosidase é
10 castanospermine.

72. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 55 ou 56, caracterizada pelo fato de que o inibidor de histona deacetilase é selecionado do grupo que consiste em Scriptaid, APHA composto 8, Apicidina, butirato de sódio, (-)-Depudecin,
15 Sirtinol, Tricostatin A, e sais ou análogos destes.

73. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 72, caracterizada pelo fato de que o inibidor de histona deacetilase é Scriptaid.

74. COMPOSIÇÃO, de acordo com qualquer uma das
20 reivindicações 55-73, caracterizada pelo fato de que o PCD ocular é selecionado do grupo que consiste em degeneração macular relacionada com a idade, retinite pigmentosa, glaucoma, distrofia corneal, retinosquise, mal de Stargardt, gânglios dominantes autossomais, ou distrofia macular de
25 Best.

75. KIT PARA O TRATAMENTO DE UM PCD OCULAR, sendo que o kit é caracterizado pelo fato de compreender:

uma quantidade eficaz de 11-cis-retinal ou 9-cis-retinal; e

30 uma quantidade eficaz de pelo menos um composto adicional selecionado do grupo que consiste em um inibidor proteassomal, um inibidor de autofagia, um inibidor lisossomal, um inibidor do transporte de proteína do ER ao

Golgi, um inibidor de chaperonina Hsp90, um ativador da resposta a choque térmico, um inibidor de glicosidase e um inibidor de histona deacetilase.

76. KIT PARA O TRATAMENTO DE RETINITE PIGMENTOSA, sendo que o kit é caracterizado pelo fato de compreender:

uma quantidade eficaz de 11-cis-retinal ou 9-cis-retinal; e

uma quantidade eficaz de pelo menos um composto adicional selecionado do grupo que consiste em um inibidor proteassomal, um inibidor de autofagia, um inibidor lisossomal, um inibidor do transporte de proteína do ER ao Golgi, um inibidor de chaperonina Hsp90, um ativador da resposta a choque térmico, um inibidor de glicosidase e um inibidor de histona deacetilase.

77. KIT, de acordo com a reivindicação 75 ou 76, caracterizado pelo fato de que o inibidor proteassomal é selecionado do grupo que consiste em MG132, lactocistina, clasto-lactocistin-beta-lactona, PSI, MG-115, MG-101, N-Acetil-Leu-Leu-Met-CHO, N-carbobenzoil-Gli-Pro-Fe-Leu-CHO, N-carbobenzoil-Gli-Pro-Ala-Fe-CHO, N-carbobenzoil-Leu-Leu-Fe-CHO, e os sais ou análogos destes.

78. KIT, de acordo com a reivindicação 75 ou 76, caracterizado pelo fato de que o inibidor proteassomal é um inibidor reversível de proteasoma.

79. KIT, de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo fato de que o inibidor proteassomal reversível é MG132.

80. KIT, de acordo com a reivindicação 75 ou 76, caracterizado pelo fato de que o inibidor de autofagia é selecionado do grupo que consiste em 3-metil adenina, 3-metil adenosina, adenosina, ácido ocadaico, N⁶-mercaptopurina riboside (N⁶-MPR), 5-amino-4-imidazol carboxamida riboside (AICAR), bafilomicin A1, e os sais ou análogos destes.

81. KIT, de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que o inibidor de autofagia é a 3-metil adenina.

5 82. KIT, de acordo com a reivindicação 75 ou 76, caracterizado pelo fato de que o inibidor lisossomal é selecionado em que do grupo que consiste em leupeptina, trans-epoxisaccinil-L-leucilamida-(4-guanidino)butano, éster metílico de L-metionina, cloreto de amônio, metilamina, cloroquina, e os sais ou os análogos destes.

10 83. KIT, de acordo com a reivindicação 82, caracterizado pelo fato de que o inibidor lisossomal é o cloreto de amônio.

15 84. KIT, de acordo com a reivindicação 75 ou 76, caracterizado pelo fato de que o inibidor do transporte de proteína do ER ao Golgi é o brefeldin A e os sais ou os análogos deste.

20 85. KIT, de acordo com a reivindicação 75 ou 76, caracterizado pelo fato de que o inibidor de chaperonina Hsp90 é selecionado do grupo que consiste em antibióticos de benzoquinona ansamicina, Geldanamicina, 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina, radicicol, novobiocina, e um inibidor de Hsp90 que se liga ao bolso de Hsp90 ATP/ADP, e os sais ou análogos destes.

25 86. KIT, de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que o inibidor de chaperonina Hsp90 é a Geldanamicina.

30 87. KIT, de acordo com a reivindicação 75 ou 76, caracterizado pelo fato de que um ativador da resposta a choque térmico é selecionado do grupo que consiste em Celastrol, éster metílico de celastrol, diacetato de diidrocelastrol, éster butílico de celastrol, e diidrocelastrol.

88. KIT, de acordo com a reivindicação 87, caracterizado pelo fato de que o ativador da resposta a choque térmico é o Celastrol.

89. KIT, de acordo com a reivindicação 87,
5 caracterizado pelo fato de que o ativador da resposta a choque térmico é o diidro-celastrol.

90. KIT, de acordo com a reivindicação 75 ou 76, caracterizado pelo fato de que o inibidor de glicosidase é selecionado do grupo que consiste em cloridreto de
10 australina, castanospermine, 6-Acetamido-6-deoxi-castanospermine, cloridreto de deoxifuconojirimicina (DFJ), deoxinojirimicina (DNJ), cloridreto de deoxigalactonojirimicina (DGJ), cloridreto de deoximannojirimicina (DMJ), cloridreto de 2R,5R-
15 Bis(hidroximetil)-3R,4R-diidroxi-pirrolidina (DMDP), 1,4-Dideoxi-1,4-imino-D-manitol, cloridreto de 3R,4R,5R,6R-3,4,5,6-Tetrahidroxiazepane, 1,5-Dideoxi-1,5-imino-xilitol, Kifunensine, N-butildeoxinojirimicina (BDNJ), N-nonil DNJ (NDNJ), N-hexil DNJ (HDNJ), N-metildeoxinojirimicina (MDNJ),
20 e os sais ou análogos destes.

91. KIT, de acordo com a reivindicação 90, caracterizado pelo fato de que o inibidor de glicosidase é castanospermine.

92. KIT, de acordo com a reivindicação 75 ou 76,
25 caracterizado pelo fato de que o inibidor de histona deacetilase é selecionado do grupo que consiste em Scriptaid, APHA composto 8, Apicidin, butirato de sódio, (-)-Depudecin, Sirtinol, Trichostatin A, e os sais ou análogos destes.

93. KIT, de acordo com a reivindicação 92,
30 caracterizado pelo fato de que o inibidor de histona deacetilase é Scriptaid.

94. MÉTODO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE UM COMPOSTO ÚTIL PARA O TRATAMENTO DE UM INDIVÍDUO QUE TEM UM PCD OCULAR, sendo que o método é caracterizado pelo fato de compreender:

a) a colocação de uma célula *in vitro* que expressa uma proteína erroneamente multiplicada em contato com um composto candidato; e

b) a determinação do rendimento da proteína corretamente multiplicada recuperada da célula em relação a uma célula de controle, em que um aumento no rendimento da proteína corretamente multiplicada nas células contatadas identifica um composto útil para o tratamento de um indivíduo que tem um PCD.

95. MÉTODO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE UM COMPOSTO ÚTIL PARA O TRATAMENTO DE UM INDIVÍDUO QUE TEM RETINITE PIGMENTOSA, sendo que o método é caracterizado pelo fato de compreender:

a) a colocação de uma célula que expressa uma proteína erroneamente multiplicada *in vitro* em contato com

(i) 11-cis-retinal ou 9-cis-retinal, e

(ii) um composto candidato; e

b) a determinação do rendimento da proteína corretamente multiplicada recuperada da célula em relação a uma célula de controle, em que um aumento no rendimento da proteína corretamente multiplicada na célula contatada identifica um composto útil para o tratamento de um indivíduo que tem retinite pigmentosa.

96. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 94 ou 95, caracterizado pelo fato de que 11-cis-retinal é um isômero travado de sete anéis de 11-cis-retinal.

97. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 94 ou 95, caracterizado pelo fato de que a proteína erroneamente multiplicada compreende uma mutação.

98. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 94 ou 95, caracterizado pelo fato de que a proteína erroneamente multiplicada é uma opsina.

99. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 98,
5 caracterizado pelo fato de que a opsina compreende uma mutação de P23H.

100. USO DE UM INIBIDOR PROTEASSOMAL OU UM INIBIDOR DE AUTOFAGIA, caracterizado por ser na preparação de um medicamento para tratar um indivíduo que tem um distúrbio de
10 conformação de proteína (PCD), tratamento este que consiste em administrar quantidades suficientes de um inibidor proteassomal ou um inibidor de autofagia para tratar um indivíduo.

101. USO DE UM INIBIDOR PROTEASSOMAL OU UM INIBIDOR
15 DE AUTOFAGIA, caracterizado por ser na preparação de um medicamento para tratar um indivíduo que tem retinite pigmentosa, tratamento este que consiste em administrar quantidades suficientes de um inibidor proteassomal ou um inibidor de autofagia para tratar um indivíduo.

20 102. USO, de acordo com a reivindicação 100 ou 101, caracterizado pelo fato de que o inibidor proteassomal é um inibidor reversível de proteasoma.

103. USO, de acordo com a reivindicação 102,
caracterizado pelo fato de que o inibidor proteassomal
25 reversível é MG132.

104. USO, de acordo com a reivindicação 100 ou 101, caracterizado pelo fato de que o inibidor de autofagia é selecionado do grupo que consiste em 3-metil adenina, 3-metil adenosina, adenosina, ácido ocadaico, N⁶-mercaptopurina
30 riboside (N⁶-MPR), um análogo de adenosina aminotiolado, 5-amino-4-imidazol carboxamida riboside (AICAR), e bafilomicin A1.

105. USO, de acordo com a reivindicação 104, caracterizado pelo fato de que o inibidor de autofagia é a 3-metil adenina.

106. MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PROTEÍNA RECOMBINANT EM UMA CONFORMAÇÃO BIOQUIMICAMENTE FUNCIONAL, sendo que o método é caracterizado pelo fato de compreender:

a) a colocação de uma célula que expressa a proteína recombinante em contato com um composto selecionado do grupo que consiste em um inibidor proteassomal, um inibidor de autofagia, um inibidor lisossomal, um inibidor do transporte de proteína do ER ao Golgi, um inibidor de chaperonina Hsp90, um ativador da resposta a choque térmico, um inibidor de glicosidase e um inibidor de histona deacetilase; e

b) o isolamento da proteína recombinante da célula, em que o método produz uma proteína recombinante em uma conformação bioquimicamente funcional.

107. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 107, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente a medição da atividade biológica da proteína.

108. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 107, caracterizado pelo fato de que a atividade biológica é detectada utilizando um ensaio enzimático.

109. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 107, caracterizado pelo fato de que a atividade biológica é detectada espectrofotometricamente.

110. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 107, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente contatando a célula com 11-cis-retinal.

111. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 107, caracterizado pelo fato de que a célula é uma célula eucariótica.



112. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 111, caracterizado pelo fato de que a célula é uma célula de levedura.

113. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 111,
5 caracterizado pelo fato de que a célula é uma célula de mamífero.

2023

Efeito do inibidor proteasomal MG132
Efeito de MG132 no rendimento de P23H rodopsina

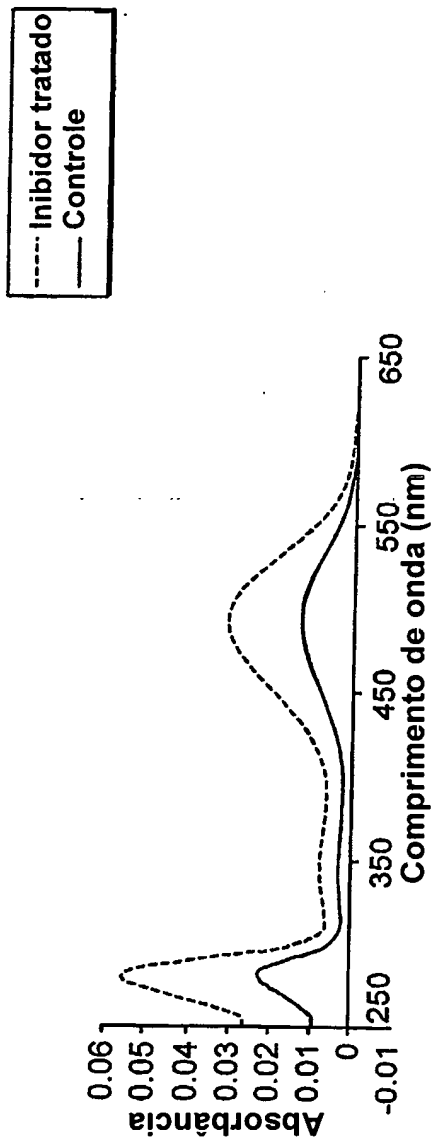


FIG. 1A

Efeito de MG132 no rendimento de WT rodopsina

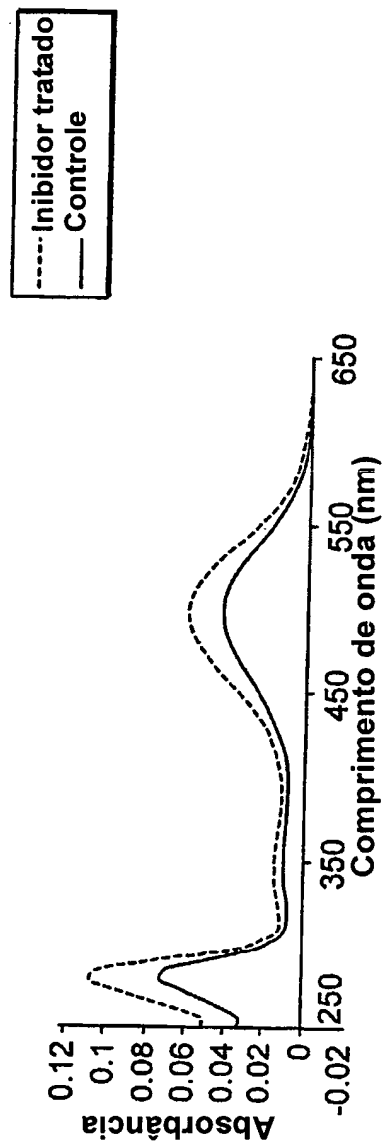


FIG. 1B

Efeito do inibidor de autofagia 3-metil adenina
Efeito de 3-MA no rendimento de P23H rodopsina

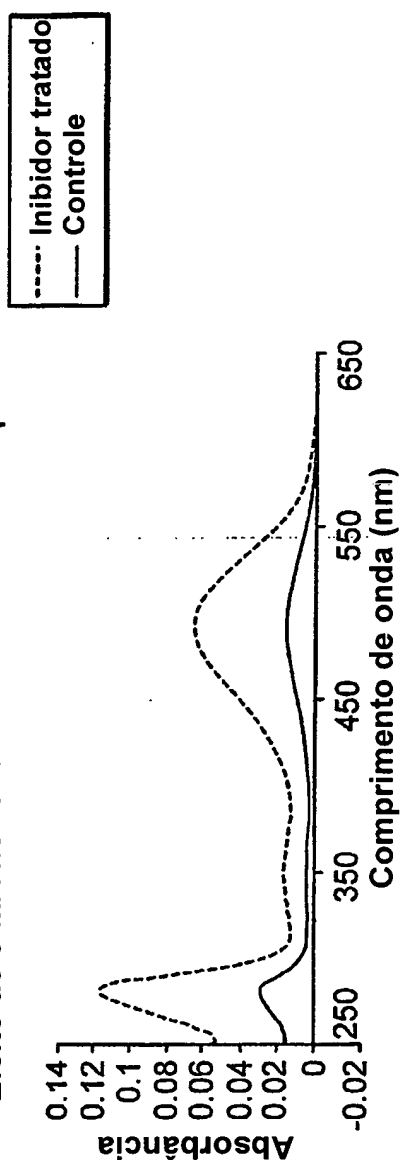


FIG. 2A

Efeito de 3-MA no rendimento de WT rodopsina

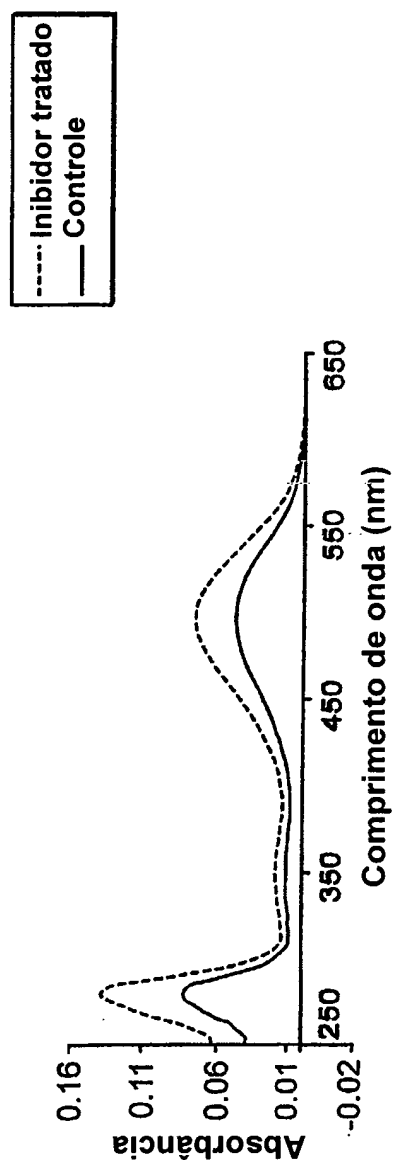


FIG. 2A

Efeito do inibidor lisossomal NH4
Efeito de NH4Cl no rendimento de P23H rodopsina

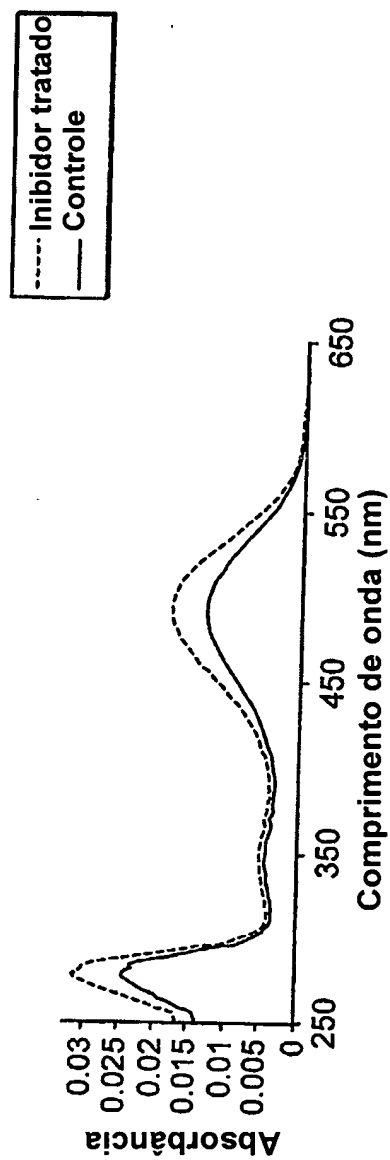


FIG. 3A

Efeito de NH4Cl no rendimento de WT rodopsina

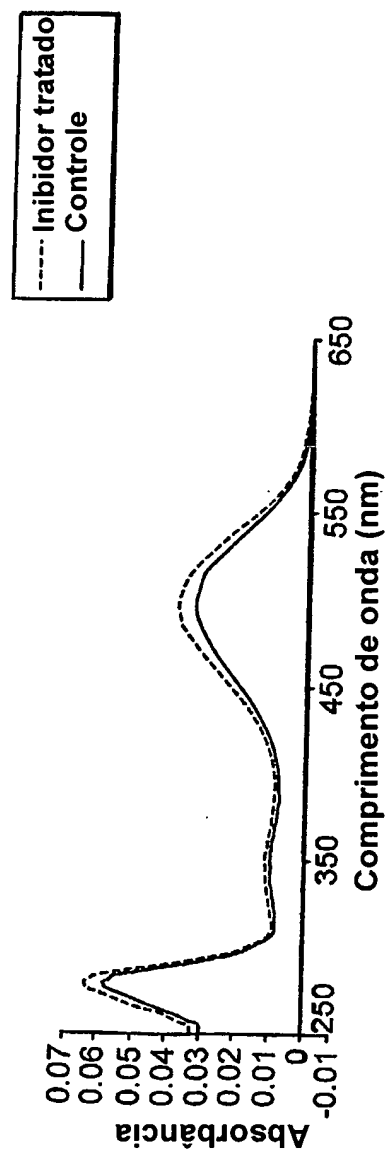


FIG. 3B

**Efeito do inibidor de transporte ER-Golgi Brefeldin A
Efeito de BfA no rendimento de P23H rodopsina**

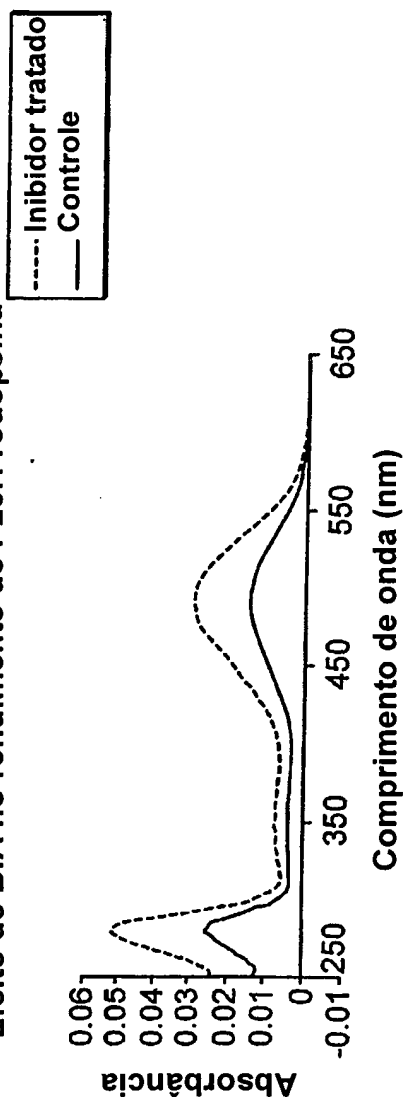


FIG. 4A

Efeito de BfA no rendimento de WT rodopsina

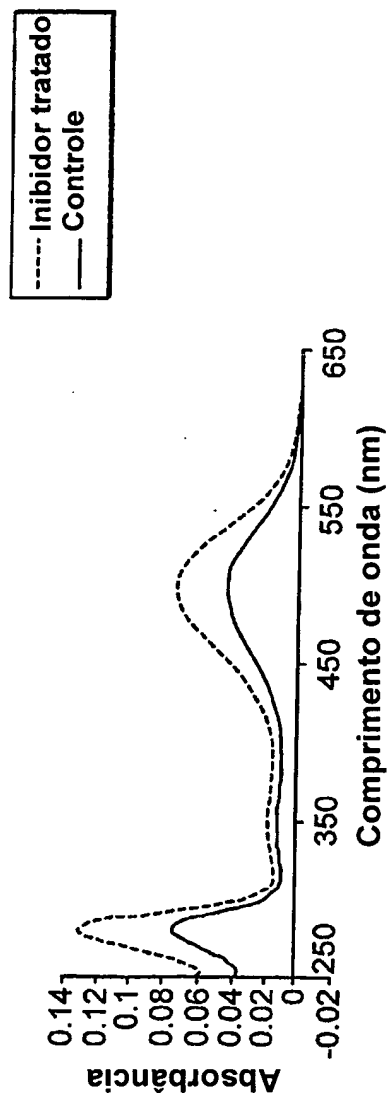


FIG. 4B

Efeito do inibidor de Hsp90 Geldanamicina
Efeito de Geldanamicina no rendimento de P23H rodopsina

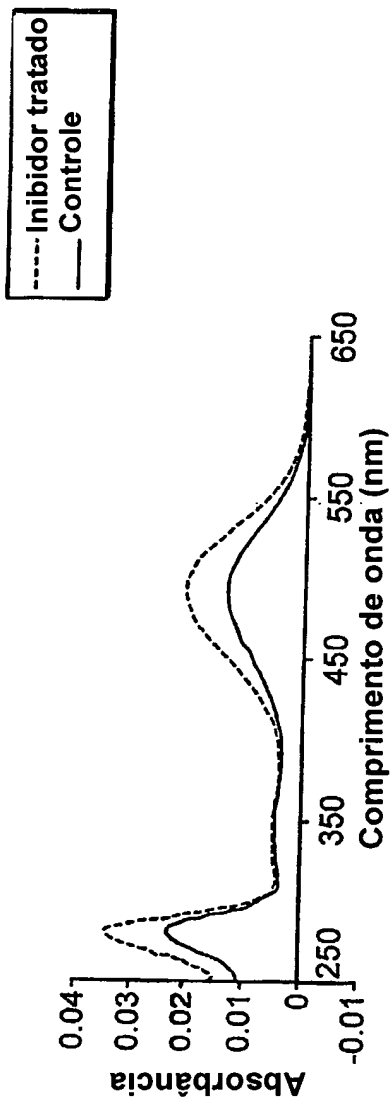


FIG. 5A

Efeito de Geldanamicina no rendimento de WT rodopsina

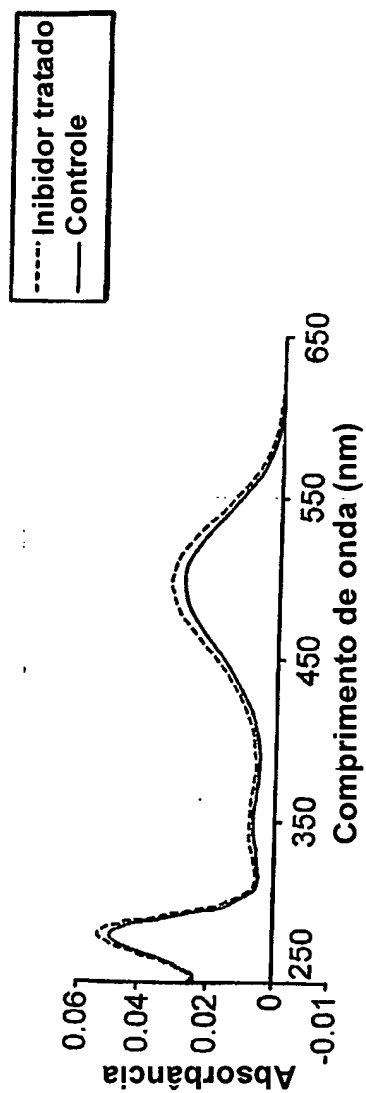


FIG. 5B

Efeito de anti-oxidante anti-inflamatório Celastrol
Efeito de Celastrol no rendimento de P23H rodopsina

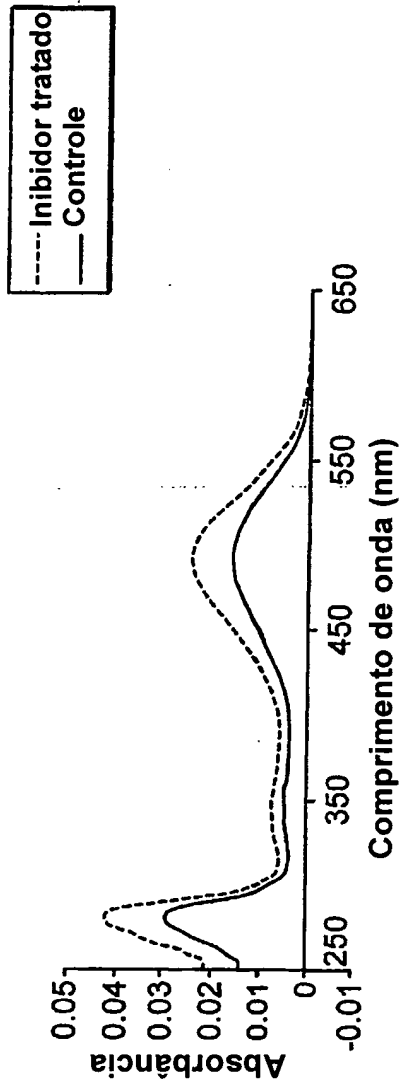


FIG. 6A

Efeito de Celastrol na WT rodopsina

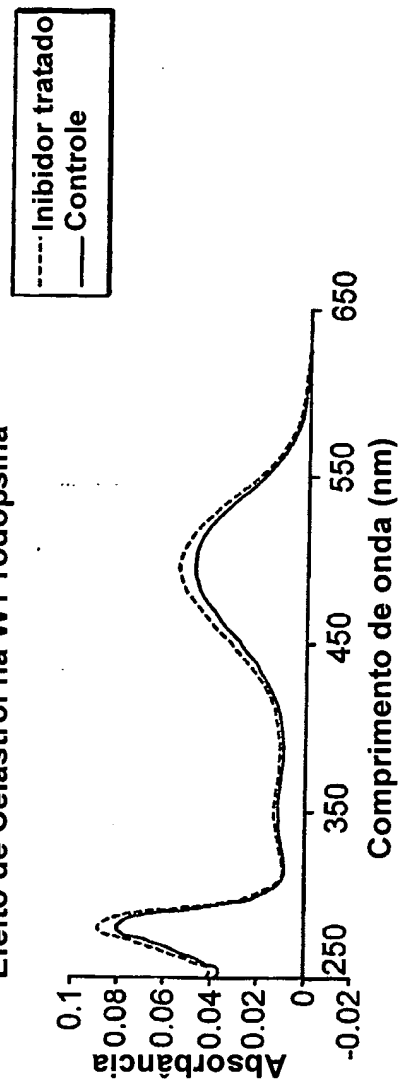


FIG. 6B

Efeito de diidro-Celastrol
Efeito de diidro-Celastrol no rendimento de P23H rodopsina

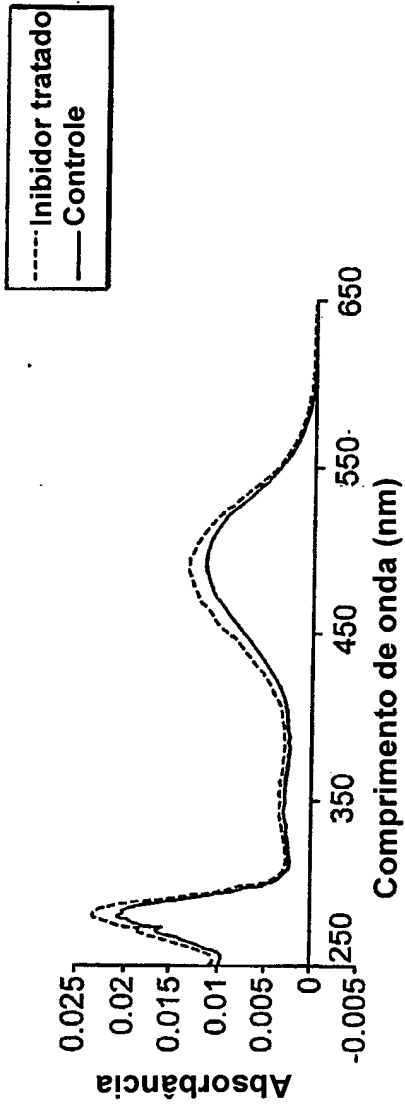


FIG. 7A

Efeito de diidro-Celastrol no rendimento de WT rodopsina

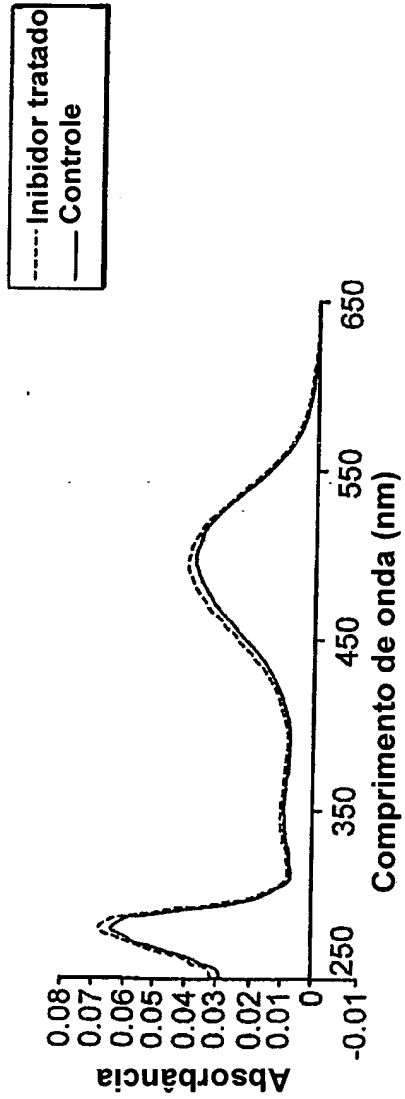
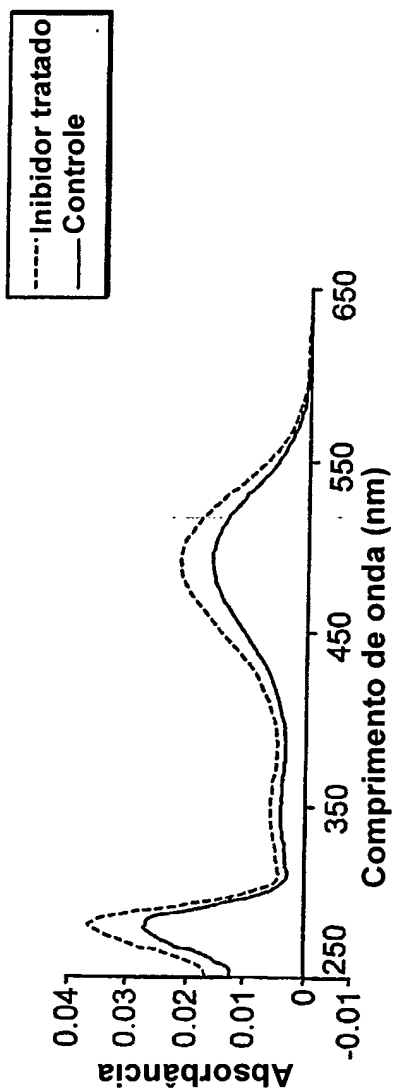


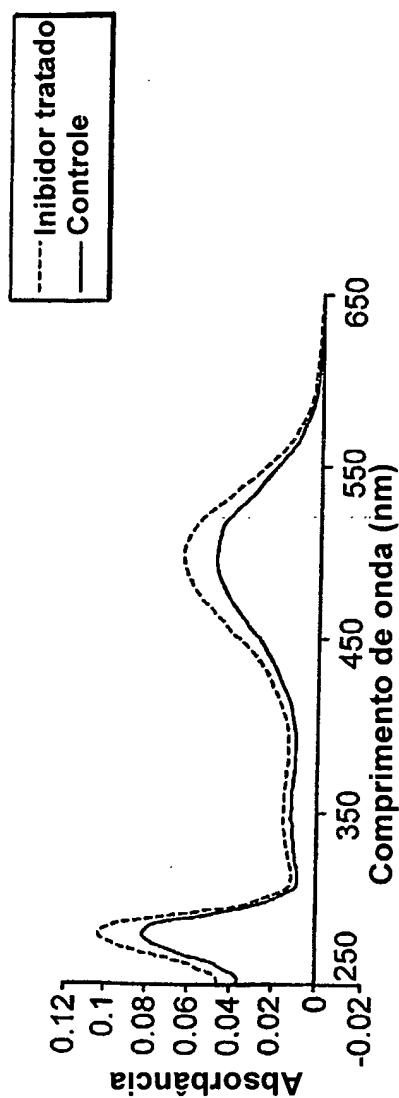
FIG. 7B

Efeito do inibidor de deacetilase de histona Scriptaid
Efeito de Scriptaid no rendimento de P23H rodopsina



8/8

Efeito de Scriptaid no rendimento de WT rodopsina



RESUMO

USO DE UM COMPOSTO SELECIONADO DO GRUPO QUE
CONSISTE EM UM INIBIDOR PROTEASSOMAL, UM INIBIDOR DE
AUTOFAGIA, UM INIBIDOR LISSOSSOMAL, UM INIBIDOR DO TRANSPORTE
5 DE PROTEÍNA DO ER AO GOLGI, UM INIBIDOR DE CHAPERONINA HSP90,
UM ATIVADOR DA RESPOSTA A CHOQUE TÉRMICO, UM INIBIDOR DE
GLICOSIDASE, E UM INIBIDOR DE HISTONA DEACETILASE, USO DE 11-
CIS-RETINAL OU 9-CIS-RETINAL E UM COMPOSTO SELECIONADO DO
GRUPO QUE CONSISTE EM UM INIBIDOR PROTEASSOMAL, UM INIBIDOR
10 DE AUTOFAGIA, UM INIBIDOR LISSOSSOMAL, UM INIBIDOR DO
TRANSPORTE DE PROTEÍNA DO ER AO GOLGI, UM INIBIDOR DE
CHAPERONINA HSP90, UM ATIVADOR DE RESPOSTA A CHOQUE TÉRMICO,
UM INIBIDOR DE GLICOSIDASE, E UM INIBIDOR DE HISTONA
DEACETILASE, MÉTODO PARA AUMENTAR A QUANTIDADE DE UM
15 CONFORMAÇÃO BIOQUIMICAMENTE FUNCIONAL DE UMA PROTEÍNA EM UMA
CÉLULA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE UM PCD
OCULAR, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE RETINITE
PIGMENTOSA, KIT PARA O TRATAMENTO DE UM PCD OCULAR, KIT PARA
O TRATAMENTO DE RETINITE PIGMENTOSA, MÉTODO PARA A
20 IDENTIFICAÇÃO DE UM COMPOSTO ÚTIL PARA O TRATAMENTO DE UM
INDIVÍDUO QUE TEM UM PCD OCULAR, MÉTODO PARA A IDENTIFICAÇÃO
DE UM COMPOSTO ÚTIL PARA O TRATAMENTO DE UM INDIVÍDUO QUE TEM
RETINITE PIGMENTOSA, USO DE UM INIBIDOR PROTEASSOMAL OU UM
INIBIDOR DE AUTOFAGIA E MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA
25 PROTEÍNA RECOMBINANT EM UMA CONFORMAÇÃO BIOQUIMICAMENTE
FUNCIONAL

A invenção caracteriza composições e métodos que
são úteis para o tratamento ou a prevenção de uma doença de
conformação de proteína em um indivíduo corrigindo as
30 proteínas in vivo. Além disso, a invenção apresenta
composições e métodos que são úteis para expressar uma
proteína recombinante em uma conformação bioquimicamente
funcional.